

**SERUMSPIEGEL VON TRIJODTHYRONIN
UND THYROXIN**

**EIN SÄULENCHROMATOGRAPHISCHES
TRENNVERFAHREN MIT CHEMISCHEM
JODNACHWEIS**

Thomas Heinrich Ruhl

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR DR. MED. E. BUCHBORN

SERUMSPIEGEL VON TRIJODTHYRONIN UND THYROXIN

EIN SÄULENCHROMATOGRAPHISCHES TRENNVERFAHREN

MIT CHEMISCHEM JODNACHWEIS ⁺

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN

VERFASST UND EINER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

THOMAS HEINRICH RUHL

AUS

ANSBACH

1974

⁺ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. P.C. Scriba
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	17.9.1974



Die Eltern sind die wichtigsten Personen im Leben
des Kindes. Sie sind die ersten Lehrer und Vorbilder.
Sie vermitteln die Werte und Normen der Gesellschaft.
Sie sind die ersten Freunde und Helfer. Sie sind die
ersten, die das Kind lieben und beschützen.

Die Eltern sind die ersten, die das Kind in die Welt
einführen. Sie sind die ersten, die ihm zeigen, wie man
mit anderen Menschen umgeht.

Die Eltern sind die ersten, die das Kind in die Welt
einführen. Sie sind die ersten, die ihm zeigen, wie man
mit anderen Menschen umgeht.

MEINEN ELTERN

Die Eltern sind die ersten, die das Kind in die Welt
einführen. Sie sind die ersten, die ihm zeigen, wie man
mit anderen Menschen umgeht.

Die Eltern sind die ersten, die das Kind in die Welt
einführen. Sie sind die ersten, die ihm zeigen, wie man
mit anderen Menschen umgeht.

Die Eltern sind die ersten, die das Kind in die Welt
einführen. Sie sind die ersten, die ihm zeigen, wie man
mit anderen Menschen umgeht.

Die Eltern sind die ersten, die das Kind in die Welt
einführen. Sie sind die ersten, die ihm zeigen, wie man
mit anderen Menschen umgeht.

"Vielleicht liegt die wichtigste Funktion der vielgeschmähten wissenschaftlichen Arbeit zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin für die jungen Kollegen darin, einmal selbst die systematischen Fehler bei der Ermittlung von Daten, ihrer Berechnung und Bewertung erlebt zu haben."

(R.GROSS: Medizinische Diagnostik- Grundlagen und Praxis. Springer, Berlin Heidelberg New York, 76 (1969).

Daß über solche "Erlebnisse" hinaus die vorliegende Dissertation entstehen konnte, verdanke ich vor allem der umfassenden Förderung durch meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. P.C. Scriba, sowie der unermüdlichen Hilfestellung von Herrn Dr. med. K. Horn.

Weiterhin habe ich unter all den anderen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere zu danken:

Frau PD. Dr. med. C.R. Pickardt, Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. F. Erhardt und meinen Mitdoktoranden G. Hallhuber, J. Habermann, H. Borowzak und J. Priller für viele wertvolle Diskussionen und Anregungen;

Herrn J. Henner für seine unermüdliche Mitarbeit, wenn es galt, technische Probleme zu lösen;

Fräulein F. Haag für die Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen.

INHALT

<u>Kapitel</u>		<u>Seite</u>
	Liste der Abkürzungen	
1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODE ZUR GETRENNTEN BESTIMMUNG DES GESAMT- T_3 UND - T_4 IM SERUM	5
2.1.	PRINZIP DER METHODE	5
2.2.	EXTRAKTION DER SCHILDDRÜSENHORMONE AUS DEM SERUM	7
2.2.1.	Präparation der Extraktionssäulen	7
2.2.2.	Extraktion	7
2.2.3.	Nachwaschen und Elution	7
2.3.	ABTRENNUNG DES T_3 VOM T_4	10
2.3.1.	Präparation der Trennsäulen	10
2.3.2.	Auftragen der Eluate von der Extraktionssäule	10
2.3.3.	Trennung und Elution	11
2.4.	KONZENTRIEREN DER ELUTIONSPEAKS	13
2.4.1.	Volumenreduktion auf Konzentrier- säulen	13
2.4.1.1.	Präparation der Konzentriersäulen	13
2.4.1.2.	Ansäuern der Eluate von der Trenn- säule	13
2.4.1.3.	Auffangen des getrennten T_3 und T_4	14
2.4.1.4.	Nachspülen der Konzentriersäulen	14
2.4.1.5.	Elution des T_3 bzw. T_4	14
2.4.2.	Eindampfen der Eluate mit gleich- zeitiger Dejodierung des T_3 bzw. T_4	16
2.5.	CHEMISCHER JODNACHWEIS	19
2.5.1.	Prinzip AutoAnalyzer - System	19
2.5.2.	Aufbau und Funktion der Apparatur	21
2.5.2.1.	Probenehmer	21
2.5.2.2.	Pumpsystem	21

<u>Kapitel</u>	<u>Seite</u>
2.5.2.3. Heizbad	22
2.5.2.4. Photometrie	23
2.5.3. Durchführung der Mikrojodbestimmung	23
2.5.3.1. Vorbereiten eingengter Proben	23
2.5.3.2. Jodid - Standardeckurve und Messung der Proben	24
2.5.3.3. Bestimmung des Leerwertes	26
2.6. AUSWERTUNG	27
3. ERGEBNISSE ZUR METHODE	29
3.1. DAS VERFAHREN IN DEN EINZELSCHRITTEN	29
3.1.1. Extraktionssäule	29
3.1.2. Trennsäule	29
3.1.3. Konzentriersäule und Eindampfen	30
3.1.4. Chemische Jodbestimmung	31
3.2. QUALITÄTSKONTROLLE	32
3.2.1. Wiederfinderversuche im Serum	32
3.2.1.1. Radioaktive Standards	32
3.2.1.2. Kalte Standards	32
3.2.2. Wiederfinderversuche ohne Serum	33
3.2.3. Zuverlässigkeit	33
3.2.3.1. Präzision	34
3.2.3.2. Richtigkeit	36
3.2.4. Spezifität und Fehlerquellen	38
3.2.4.1. Gegenseitige Beeinflussung der T_3 - und T_4 -Werte	38
3.2.4.1.1. Rechromatographie von T_3 - ^{125}I	39
3.2.4.1.2. Rechromatographie von T_4 - ^{125}I	39
3.2.4.1.3. Chromatographie von T_4 - ^{127}I	41
3.2.4.2. Beeinflussung der T_3 -Werte durch Jodtyrosine	41

<u>Kapitel</u>	<u>Seite</u>
3.2.4.3.	Störung durch anorganisches Jodid 43
3.2.4.4.	Störung durch exogene Jodkontamination 43
3.2.4.5.	Tetrac 43
4.	KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN 44
4.1.	METHODIK 44
4.1.1.	Auswahl der Probanden 44
4.1.2.	Die klinische Beurteilung des Krankheitsbildes 44
4.1.3.	Konventionelle Schilddrüsen-Labordiagnostik 45
4.1.3.1.	PB127I 46
4.1.3.2.	T ₃ -in vitro-Test 46
4.1.3.3.	Index der freien Schilddrüsenhormone 47
4.2.	KLINISCHE ERGEBNISSE 48
4.2.1.	Normalkollektiv 48
4.2.2.	Blande Strumen 52
4.2.3.	Hyperthyreosen 54
4.2.3.1.	Klassische Form (Morbus Basedow) 54
4.2.3.2.	T ₃ -Thyreotoxikose 54
4.2.4.	Autonome Adenome der Schilddrüse 57
4.2.4.1.	Autonomes Adenom mit Hyperthyreose 57
4.2.4.2.	Autonomes Adenom ohne Hyperthyreose 57
4.2.5.	Hypothyreosen 58
5.	VORVERSUCHE ZUR METHODE 60
5.1.	EXTRAKTION DER SCHILDDRÜSENHORMONE AUS DEM SERUM MIT KATIONENAUSTAUSCHERN 60
5.1.1.	Vorüberlegungen 60
5.1.2.	Kontinuierliches chromatographisches Verfahren 61
5.1.2.1.	Säulenpräparation 61
5.1.2.2.	Benötigte Menge Austauscher 61

<u>Kapitel</u>	<u>Seite</u>
5.1.2.3.	Elution 62
5.1.2.3.1.	Vorwaschen mit Wasser 62
5.1.2.3.2.	Vorwaschen mit Kaliumchlorid- lösung 63
5.1.3.	Ausschüttelverfahren 63
5.1.3.1.	Benötigte Menge Austauscher 64
5.1.3.2.	Inkubationszeit 64
5.1.3.3.	Verbindung der Extraktion mit dem nachfolgenden Trennschritt 67
5.2.	T ₃ -T ₄ -TRENNUNG AUF SEPHADEX G-25 SUPERFINE 68
5.2.1.	Theorie und Entwicklung der Methode 68
5.2.2.	Säulenpräparation 69
5.2.3.	Auftragen der Proben 70
5.2.3.1.	Auftragen der Proben von Hand 70
5.2.3.2.	Ansaugen der Proben über die Pumpe 70
5.2.3.3.	Auftragen der Proben von der Extraktionssäule 71
5.2.4.	Voraussetzungen für eine ausreichende T ₃ -T ₄ -Trennung 71
5.2.4.1.	Säulendimension 71
5.2.4.2.	Gelmenge 72
5.2.4.3.	Temperatur 72
5.2.4.4.	Puffer 73
5.2.4.5.	Pumpgeschwindigkeit 73
5.2.5.	Fraktionensammeln und Auswertung 74
5.3.	KONZENTRIERUNG DER ELUATE DER TRENNSÄULE 75
5.3.1.	Vorüberlegungen 75
5.3.2.	Volumenreduzierung durch Säulen- chromatographie 77

<u>Kapitel</u>	<u>Seite</u>
5.3.2.1.	Säulenpräparation 77
5.3.2.2.	Ansäuern der Eluate von der Trennsäule zur Anreicherung des T_3 bzw. T_4 auf Kationenaustauschern oder Dextrangel 77
5.3.2.3.	Anionenaustauscher 78
5.3.2.4.	Kationenaustauscher 79
5.3.2.5.	Dextrangel 80
5.3.2.5.1.	Sephadex G-25 80
5.3.2.5.2.	Sephadex G-15 80
5.3.2.5.3.	Sephadex LH-20 81
5.3.3.	Eindampfen der Eluate von der Konzentrationsäule 81
5.4.	NACHWEIS DER SCHILDDRÜSENHORMONE ANHAND IHRES JODGEHALTES 83
5.4.1.	Chemische Jodbestimmung 83
5.4.1.1.	Theorie 83
5.4.1.2.	Entwicklung der Methode 85
5.4.2.	Dejodierung der Schilddrüsenhormone 87
5.4.2.1.	Theorie der katalytischen Dehalogenierung 87
5.4.2.2.	Herstellung des kupferaktivierten Zinkstaubes 90
5.4.2.3.	Praktische Durchführung 90
5.4.2.4.	Eichkurven mit T_3 - und T_4 -Standards in 1 N NaOH 91
5.5.	SCHRITTWEISE VERBINDUNG DER CHROMATOGRAPHISCHEN AUFTRENNUNG DES T_3 UND T_4 MIT DEM CHEMISCHEN JODNACHWEIS 93
5.5.1.	Eindampfschritt 93
5.5.2.	Eindampfschritt mit Dejodierung 94
5.5.3.	Bestimmung der Eluate von der Konzentrationsäule 95
6.	MATERIAL 97
6.1.	JODAMINOSÄUREN 97
6.1.1.	127-Jodaminosäuren 97
6.1.2.	125-Jodaminosäuren 98

<u>Kapitel</u>		<u>Seite</u>
6.2.	GELE UND AUSTAUSCHER FÜR DIE CHROMATOGRAPHIE	99
6.3.	VERWENDETE PUFFER	100
6.4.	REAGENZIEN FÜR DIE MIKROJOD- BESTIMMUNG	101
6.4.1.	Reinheit der Reagenzien für die Mikrojodbestimmung	102
6.5.	SERUM	103
6.5.1.	Patientenseren	103
6.5.2.	Kontrollserum	103
6.5.3.	Seruminkubation mit Jodaminosäuren	103
7.	DISKUSSION	104
7.1.	METHODE	104
7.2.	KLINIK	108
8.	ZUSAMMENFASSUNG	111
	LITERATUR	113
	LEBENS LAUF	120

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

MIT	L - 3 - Monojodtyrosin	
M ¹²⁷ _{IT}	"	(stabiles Nuklid)
M ¹²⁵ _{IT}	"	(instabiles Nuklid)
DIT	L-3,5-Dijodtyrosin	
D ¹²⁷ _{IT}	"	(stabiles Nuklid)
D ¹²⁵ _{IT}	"	(instabiles Nuklid)
T ₃	L-3,5,3'-Trijodthyronin	
T ₃ ⁻¹²⁷ _I	"	(stabiles Nuklid)
T ₃ ⁻¹²⁵ _I	"	(instabiles Nuklid)
T ₄	L-3,5,3'5'-Tetrajodthyronin = L-Thyroxin	
T ₄ ⁻¹²⁷ _I	"	(stabiles Nuklid)
T ₄ ⁻¹²⁵ _I	"	(instabiles Nuklid)
PBI, PE ¹²⁷ _I	Proteingebundenes Jod	
TBA	Thyroxin bindendes Albumin	
TBG	Thyroxin bindendes Globulin	
TEPA	Thyroxin bindendes Präalbumin	
IPM	Impulse pro Minute	
JAS	Jodaminosäure(n)	
Tetrac	3,5,3',5'-Tetrajodthyroessigsäure	
TSH	Thyreotropin, Thyreoidea stimulierendes Hormon	
TRH = TRF	Thyreotropin releasing hormon (factor)	

1. EINLEITUNG

Die Schilddrüse synthetisiert, speichert und sezerniert die beiden stoffwechselaktiven Hormone Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3).

KENDALL gelang es 1914, aus der Drüsensubstanz einen kristallinen jodhaltigen Körper zu isolieren, den er Thyroxin nannte (38). Nach Aufklärung der Struktur (26) synthetisierten HARRINGTON und BARGER 1927 die Verbindung (27). Das Trijodthyronin wurde erst 1952 von GROSS und PITT-RIVERS und ROCHE, MICHEL und LISSITZKY entdeckt (23,58). Es unterscheidet sich chemisch vom T_4 nur durch das Fehlen eines Jodatoms in Parastellung zur phenolischen Hydroxylgruppe; biologisch zeigen beide Hormone eine qualitativ gleichartige Wirkung.

Ihre Biosynthese spielt sich recht kompliziert innerhalb grosser Eiweissmoleküle, dem Thyreoglobulin, ab; der genaue Chemismus ist noch unbekannt. Die Schilddrüsenzelle reichert Jodid aus dem Serum an (Jodination) und baut es nach Oxydation zu Jod in die Aminosäure Tyrosin ein (Jodisation). So entstehen Monojodtyrosin und Dijodtyrosin. Die letzte Phase der Hormonproduktion besteht vermutlich in einer Aneinanderlagerung zweier dieser hormonell inaktiven Vorstufen unter Abspaltung eines Alaninrestes (Koppelung). Eingebaut im Thyreoglobulin bleiben die Hormone im Kolloid der Schilddrüse gespeichert und werden nach Massgabe des Bedarfs oder der Stimulation der Drüse durch das thyreotrope Hormon schliesslich freigesetzt und in die Blutbahn abgegeben.

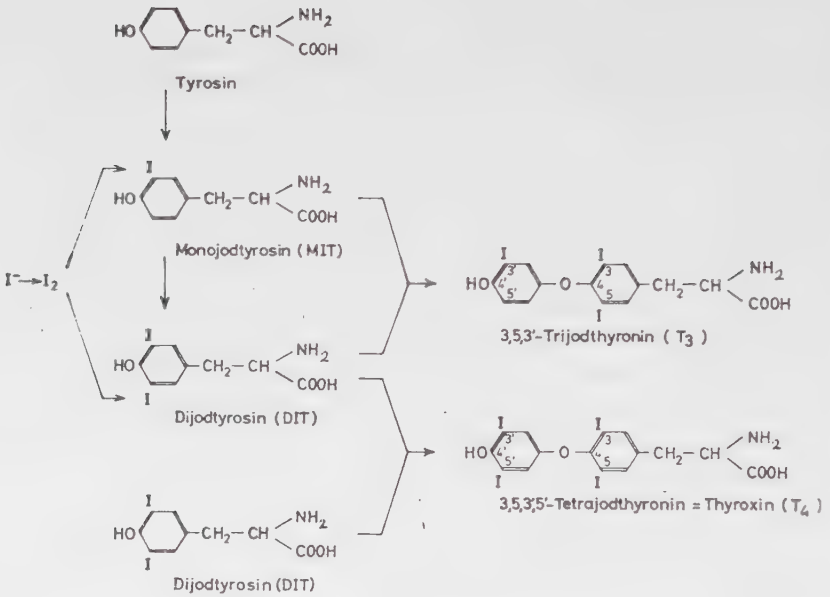


Abb. 1: Formelschema zur Biosynthese der Schilddrüsenhormone

Bis vor einigen Jahren noch wurde das T₄ als das einzige Schilddrüsenhormon mit praktischer Bedeutung für den Stoffwechsel angesehen, wie man medizinischen und biochemischen Lehrbüchern aus dieser Zeit entnehmen kann. Heute jedoch misst man auch dem T₃ erhebliche physiologische Bedeutung bei, nachdem man insbesondere durch Studien mit den radioaktiv markierten Substanzen erkannt hat, dass es trotz geringerer Konzentration im Serum einem erstaunlich hohen

Umsatz unterworfen ist und ausserdem biologisch etwa vier- bis fünfmal wirksamer ist, als das T_4 .

Bei einer Halbwertszeit von durchschnittlich 1,4 Tagen werden etwa 22,8 μg T_3 gegenüber 37 μg T_4 pro Tag bei einer Halbwertszeit von 5,8 Tagen umgesetzt (50). Diese Unterschiede liegen vor allem in den differierenden Eiweissbindungsverhältnissen beider Hormone in Serum begründet. T_3 und T_4 sind dort nämlich nach dem Massenwirkungsgesetz zum überwiegenden Teil an spezifische Transportproteine (TBG, TBA, TBPA) gebunden, nur ein kleiner Teil zirkuliert in freier Form. Von diesem freien Anteil aber hängt die biologische Aktivität und die Höhe des Umsatzes ab, beim T_3 ist er mit etwa 0,5% erheblich höher als beim T_4 mit weniger als 0,05% (49, 57).

Nun hat das T_3 darüber hinaus auch aufgrund pathophysiologischer Erwägungen steigendes Interesse gefunden. In der Klinik fallen nämlich immer wieder Patienten auf, bei denen die durch konventionelle Methoden der Schilddrüsenfunktionsdiagnostik (siehe Tab. 1) gewonnenen Daten nicht mit dem klinischen Bild übereinstimmen. Das ist z.B. der Fall bei der sog. T_3 -Thyreotoxikose: Ein Patient mit normalem Serum- T_4 -Gehalt bei normalem TBG (dem entspricht in etwa ein normaler Ausfall des T_3 -in vitro-Tests) zeigt das klinische Bild einer Schilddrüsenüberfunktion - offensichtlich aufgrund eines disproportioniert erhöhten Serum- T_3 -Spiegels. Eine weitere Diskrepanz besteht zwischen den im Mittel deutlich erniedrigten Werten des PBI, des T_4 und des T_3 -in vitro-Tests und der klinisch euthyreoten Stoffwechsellage von Patienten mit blander Struma. Hier und in weiteren Fällen, die noch diskutiert werden (siehe 7.2.), muss eine

Veränderung der T_3 -Gehalte im Serum angenommen werden; nähere Aufschlüsse und eine Bereicherung der diagnostischen Möglichkeiten erhoffte man sich deshalb von einer Bestimmung der T_3 - neben den T_4 -Absolutspiegeln.

In den letzten Jahren wurde auch eine Reihe verschiedener Methoden zur getrennten Bestimmung der Schilddrüsenhormone publiziert. Eingesetzt wurden dazu Dünnschicht- bzw. Papierchromatographie (19, 48, 68, 69, 76), Säulenchromatographie (52), Gaschromatographie (29,30) und - während diese Arbeit entstand - erstmals auch Radioimmunoassay (8,22,43). Die Problematik dieser Methoden wird an anderer Stelle diskutiert (7.1.). Unser Ziel war die Verbindung eines säulenchromatographischen Trennverfahrens (25) mit einer chemischen Hormonjodbestimmung. Dazu waren folgende Schritte erforderlich:

- ▷ Isolierung der Schilddrüsenhormone aus dem Serum, um sie aus der starken Proteinbindung zu lösen.
- ▷ Abtrennung des T_3 vom T_4 zum getrennten Nachweis.
- ▷ Chemische Bestimmung der Schilddrüsenhormone anhand ihres Jodgehaltes.

2. METHODE ZUR GETRENNTEN BESTIMMUNG DES GESAMT-T₃ UND -T₄ IM SERUM

2.1. PRINZIP DER METHODE

Unser Vorgehen ist in Abb. 2 aufgezeigt (59,37):

Die Schilddrüsenhormone T₃ und T₄ werden durch Ausschüteln mit einem stark sauren Kationenaustauscher aus dem Serum extrahiert (Abb.2,a). Durch Nachwaschen mit KCl-Lösung werden die Proteine eluiert und verworfen (Abb.2,b). Gleichzeitig findet dadurch ein Gegenionenaustausch von H⁺ gegen K⁺ statt. Nach Koppelung dieser Extraktionssäule mit der Trennsäule werden T₃ und T₄ mit alkalischem Kaliumphosphatpuffer in einem schmalen Peak eluiert und gleichzeitig auf diese zweite Säule aufgetragen (Abb.2,c). Durch Nachwaschen mit dem gleichen Puffer erfolgt die Abtrennung des T₃ vom T₄ auf Dextrangel, wobei T₃ vor T₄ eluiert wird (Abb.2,d). T₃ wird auf kleinen dritten und danach T₄ auf ebensolchen Säulen mit einem schwach sauren Kationenaustauscher durch kontinuierliches Zuspeisen von HCl-Lösung aufgefangen (Abb.2,e). Durch Verwendung von zwei 25 Kanal-Peristaltikpumpen (Fa.Ismatec, Zürich) können 25 Proben gleichzeitig aufgearbeitet werden. Nach Nachwaschen der Konzentratorsäulchen mit HCl-Lösung und Aqua bidest. werden T₃ bzw. T₄ mit NH₃-Lösung eluiert (Abb.2,f). Diese Eluate werden nach Zugabe von kupferaktiviertem Zinkstaub zur reduktiven Dehalogenierung unter rezirkulierendem Stickstoff eingedampft. Nach Wiederaufnahme der Rückstände in Natronlauge und nochmaliger Dejodierung erfolgt die mikrochemische Jodbestimmung nach der Ce(IV)/As(III)-Reaktion. Mit dem beschriebenen Verfahren wird der Jodgehalt der Proben colorimetrisch in einem automatischen, kontinuierlich fließenden System nach dem Technikon-AutoAnalyzer-Prinzip gemessen (31).

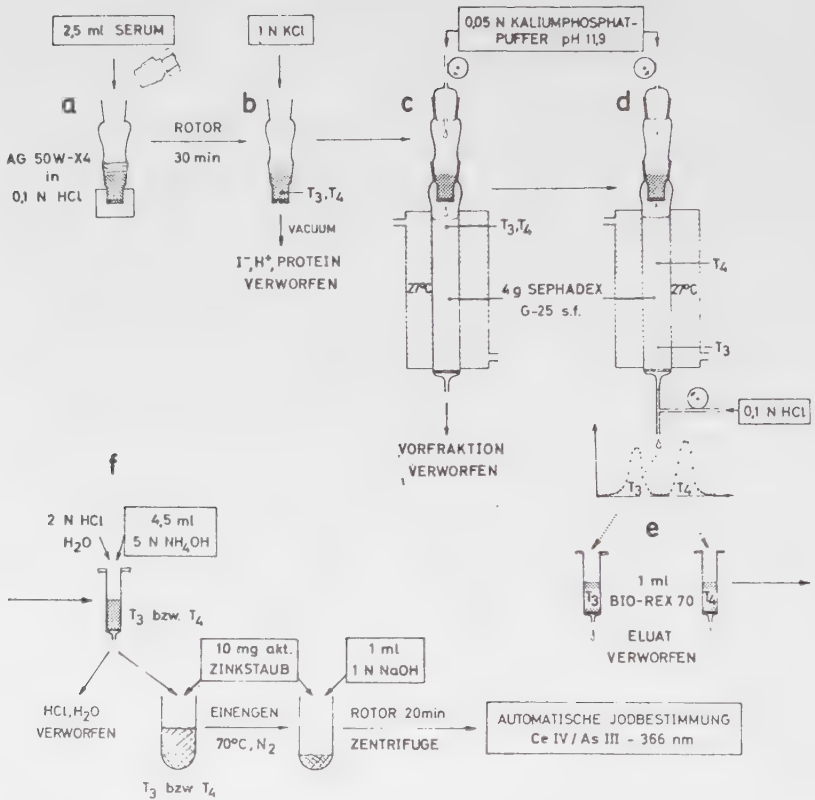


Abb.2: Fließschema der Methode zur Bestimmung des Gesamt- T_3 und T_4 im Serum

- Extraktion von T_3 und T_4 aus dem Serum (2.2.)
- Gegenionenaustausch (H^+ gegen K^+) und Nachspülen (2.2.3.)
- Elution des T_3 und T_4 auf die Trennsäule (2.3.2.)
- Abtrennung des T_3 vom T_4 (2.3.3.)
- Konzentrierung des T_3 - und danach des T_4 -Peaks (2.4.1.)
- Elution des T_3 oder T_4 von den Konzentratorsäulen (2.4.1.5.). Eindampfen mit gleichzeitigem Dejodieren (2.4.2.) und chemischer Jodnachweis (2.5.)

2.2. EXTRAKTION DER SCHILDDRÜSENHORMONE AUS DEM SERUM

2.2.1. Präparation der Extraktionssäulen

Eine grössere Menge des stark sauren Kationenaustauschers AG 50 W-X4 minus 400 mesh wurde mit jeweils dem doppelten Volumen an 0,1 N HCl über Nacht gequellt und durch Aufschütteln und Dekandieren nach Sedimentation mindestens dreimal nachgewaschen. Schliesslich wurde der Überstand an 0,1 N HCl zum sedimentierten Austauscher ins Verhältnis 1:1 (V:V) gebracht. Nach Aufschütteln wurden unter kontinuierlichem Rühren je 2 ml dieser Suspension in 25 Glas-säulen pipettiert, die in Abb.2, a) schematisch gezeigt sind. Der Auslauf dieser "Doppelschliffssäulchen" war in halbdurchbohrte Silikongummistopfen oder in eine Gummiplatte mit mehreren Bohrungen gesteckt und damit dicht verschlossen.

2.2.2. Extraktion

Dazu wurden je bis zu 2,5 ml Serum, JAS-Serum-Inkubationsgemisch oder JAS-Standardlösungen (siehe 6., Material) gegeben. Die Säulen wurden dann mit Schliffstopfen verschlossen und ca. 30 min. bei Zimmertemperatur bewegt. Dadurch wurden die Schilddrüsenhormone quantitativ von den Serumproteinen abgelöst und an den Austauscher gebunden.

2.2.3. Nachwaschen und Elution

Durch Anlegen eines Unterdruckes (Wasserstrahlpumpe) vor den Auslauf der Säule und gleichzeitiges Nachspülen mit je ca. 20 ml 1 M KCl-Lösung wurde das von den Schilddrüsenhormonen befreite Serum abgesaugt und verworfen (Abb.2, b).

Die Säulchen durften bei der Waschprozedur nicht trocken laufen. Durch die KCl-Lösung wurden die am Austauscher gebundenen Kationen, vor allem H^+ gegen K^+ ausgetauscht und ausgewaschen, nicht aber die daran gebundenen Schilddrüsenhormone. Diese konnten nun mit 0,05 N Kaliumphosphatpuffer pH 11,9 in einem relativ schmalen Peak eluiert werden (Abb.3).

Bei der Bestimmung kalter Hormone im Serum wurde jedoch im geschlossenen System gearbeitet, T_3 und T_4 wurden gleichzeitig mit der Elution auf die Trennsäulen aufgetragen (2.3.2.) und nicht wie zur Abb.3 in Einzelfractionen aufgefangen.

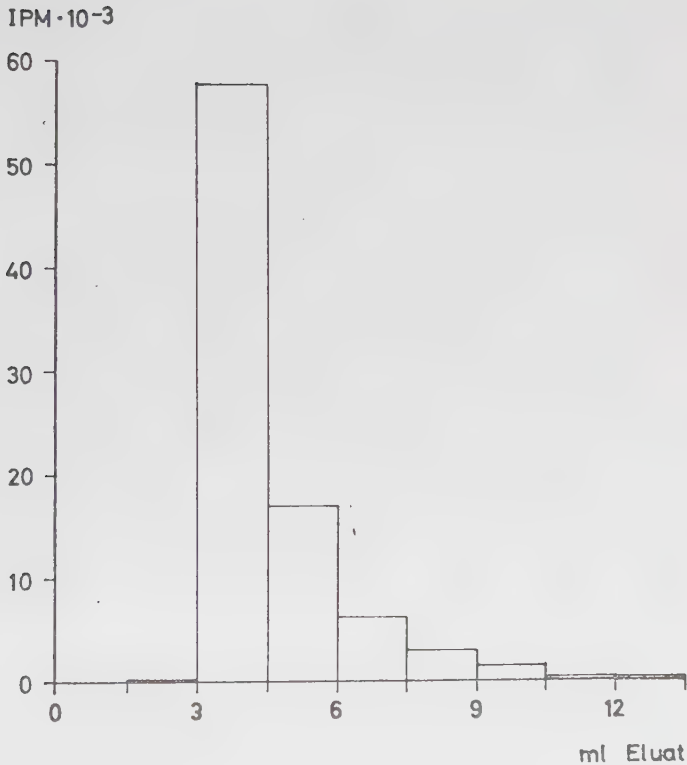


Abb.3: Elution der Schilddrüsenhormone von der Extraktionssäule.

Nach Serumextraktion (2.2.2.) und Nachspülen mit KCl (2.2.3.) wurde ein an der Austauschssäule (1ml AG 50WX4) gebundener T_3 - ^{125}I -Tracer mit 0,05 N Kaliumphosphatpuffer pH 11,9 eluiert. Nach kurzer Zeit erscheinen 94% der aufgetragenen Gesamtaktivität im schmalen Peak von 7,5 ml. Elutionskurven mit T_4 sind deckungsgleich.

2.3. ABTRENNUNG DES T₃ VOM T₄

2.3.1. Präparation der Trennsäulen

25 Glassäulen (i.D. = 13 mm, h = 18 cm) mit Glasfritten vor dem Auslauf waren vertikal in ein Wasserbad von 27° C montiert (Abb.2) und jeweils mit 4 g des stark vernetzten Dextrangels Sephadex G-25 superfine gefüllt (5.2.2.). Zur Äquilibrierung und Stabilisierung des Gelbetts wurden die Säulen über Schliffaufsätze an die 25 Kanäle einer Peristaltikpumpe (25-canal-micro-pump Fa. Ismatec, Zürich) angeschlossen und mindestens eine Stunde mit dem 0,05 N Kaliumphosphatpuffer pH 11,9 gespült. Bei einer solchen Pumpe werden 25 eingespannte Schläuche durch Andruck an ein planetengetriebenes Walzensystem kontinuierlich ausgepresst. So werden - je nach Wahl der Pumpenschläuche - konstant bestimmte Volumina in der Zeiteinheit gefördert. Bei den hier gewählten Pumpenschläuchen mit 0,035" Innendurchmesser wurden je Kanal 0,42 ml/min gepumpt.

2.3.2. Auftragen der Eluate von der Extraktionssäule

Die vorbereiteten Extraktionssäulchen (2.2.3.) wurden unterhalb des Schliffkerns gründlich mit Aqua bidest. abgespritzt und mit einem sauberen Zellstofftuch abgetrocknet. Nach Absaugen des über der Dextrangelpackung in den Trennsäulen stehenden Puffers wurden die kleinen Extraktionssäulen aufgesteckt und oben mit Schliffaufsätzen an die Pumpenschläuche angeschlossen. Eine Spur Hahnfett auf den Schliffflächen und Zug und Druck von Gummiringen oder kleinen Federn über beiden Verbindungen gewährten Dichtigkeit und liessen keine Überstände auftreten. Nach

Öffnen der Ausläufe von der Trennsäule konnte die Pumpe angestellt und damit die Chromatographie begonnen werden. So wurden T_3 und T_4 im geschlossenen System von den Extraktionssäulen in einem schmalen Peak eluiert und gleichzeitig auf die 25 Sephadexsäulen aufgetragen (Abb.2, c).

2.3.3. Trennung und Elution

Durch Fortsetzung der Chromatographie mit dem gleichen 0,05 N Kaliumphosphatpuffer pH 11,9 konnten dann die Schilddrüsenhormone simultan aufgetrennt werden (Abb.2,d). Die kleinen Extraktionssäulen blieben während des ganzen Trennvorganges auf den Trennsäulen stecken. Ein Elutionsdiagramm radioaktiv markierter Hormone von der Trennsäule, wie es bei der kombinierten Serumabtrennung und Auftrennung regelmässig gewonnen werden konnte, zeigt Abb. 4.

Bei der enugültigen Hormonbestimmung wurde im geschlossenen System gearbeitet; T_3 und T_4 wurden nicht wie in Abb.4 in Einzelfractionen gesammelt, sondern simultan mit der Elution und nacheinander auf Konzentratorsäulchen aufgefangan (2.4.1.).

IPM-103

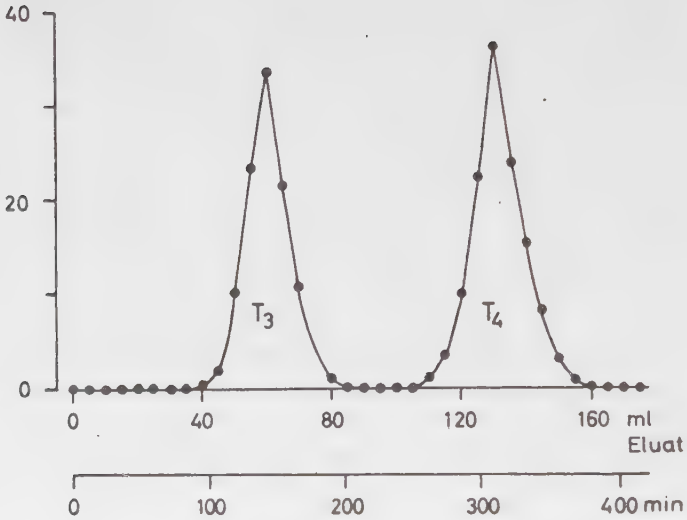


Abb.4: Abtrennung des T₃ vom T₄ auf der Trennsäule

Dargestellt sind die Elutionskurven von radioaktiven Standards nach Extraktion aus dem Serum (2.2.) und Trennung auf Sephadex-G-25 superfine (2.3.). Die Radioaktivität in den Einzelfractionen ist gegen das Volumen bzw. die Dauer der Extraktion angegeben.

2.4. KONZENTRIEREN DER ELUTIONPEAKS

2.4.1. Volumenreduktion auf Konzentriersäulen

2.4.1.1. Präparation der Konzentriersäulen

Als Chromatographiesäulen verwendeten wir 2 ml-Einmalspritzen (AMEFA, Polypropylen), vor deren Auslauf wir Filterplättchen legten, die mit einem Stopfenbohrer aus einer dreifachen Lage Glasfasermatte gestanzt waren.

Die Filterplättchen wurden dann angefeuchtet und schliesslich 1 ml Bio-Rex 70 eingefüllt. Das Harz war zuvor von der Na^+ - in die H^+ -Form gebracht worden, indem es in einem Becherglas mehrfach mit 2 N Salzsäure gewaschen worden war. Feine Schwebeteilchen, die dabei evtl. in den Überstand kamen, wurden mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Füllen der Säulchen gestaltete sich sehr einfach, indem wir wie bei der Extraktionssäule eine Suspension (mit 2 N HCl) pipettierten. Die Bio-Rex-Säulchen wurden jedesmal frisch bereitete.

2.4.1.2. Ansäuern der Eluate von der Trennsäule

Um weiterhin in einem geschlossenen Chromatographiesystem arbeiten zu können, war an jede Ausflusskapillare der Trennsäulen (2.3.3.) über ein kurzes Schlauchstück (an dem evtl. eine Klemme angesetzt werden konnte) ein T-Fitting aus Glas angeschlossen (2 mm I.D.), über dessen seitlichen Schenkel kontinuierlich aus einem der 25 Kanäle einer zweiten Schlauchpumpe 0,1 N Salzsäure zugespeist wurde (Abb.2, d). Die gewählte Pumpgeschwindigkeit

keit gewährte eine ausreichende Durchmischung von Säure (0,23 ml/min) und Puffer-Eluat (0,42 ml/min), der pH-Wert lag zwischen 4 und 6.

2.4.1.3. Auffangen des getrennten T_3 und T_4

Die erste Gruppe mit 25 Konzentriersäulchen wurde unter den Auslauf der T-Stücke gestellt, um das T_3 aus dem ersten Peak von der 85. bis 210. Minute nach Start der gesamten Chromatographie aufzufangen, die zweiten 25 Säulchen anschliessend, um das T_4 aus dem zweiten Peak von der 220. bis 370. Minute festzuhalten (Abb.2,e und Abb.4). Die Säulchen mussten nicht luftdicht an den Auslauf des T-Stückes angeschlossen werden; die vom Hormon befreiten Eluate liefen passiv ab und wurden verworfen.

2.4.1.4. Nachspülen der Konzentriersäulchen

Nach dem Konzentrierschritt (2.4.1.3.) wurden die Säulchen mit je 7,5ml 2 N Salzsäure aus einer Bürette gewaschen. Die überschüssige Salzsäure wurde dann im gleichen Verfahren sorgfältig mit je 15 ml Aqua bidest. von den Austauschersäulen ausgespült (Abb.2, f).

2.4.1.5. Elution des T_3 bzw. T_4

Zuerst wurde aus einer Bürette auf jedes Konzentriersäulchen noch 1 ml 5 N Ammoniaklösung aufgetragen und das Eluat verworfen. In ihm - es waren nur etwa 0,6 ml, da das Harz quillt - erschien noch kein Hormon, wie wir

durch Radioaktivitätsversuche festgestellt hatten (Abb.5). Das Hormon, das bis jetzt ohne Verluste am Harz gebunden blieb, wurde dann in weiteren 4,5 ml 5 N NH_4OH in Sammelgefäße (Liquid scintillation tubes, Fa. Packard, Breda/Holland) quantitativ eluiert (Abb.5).

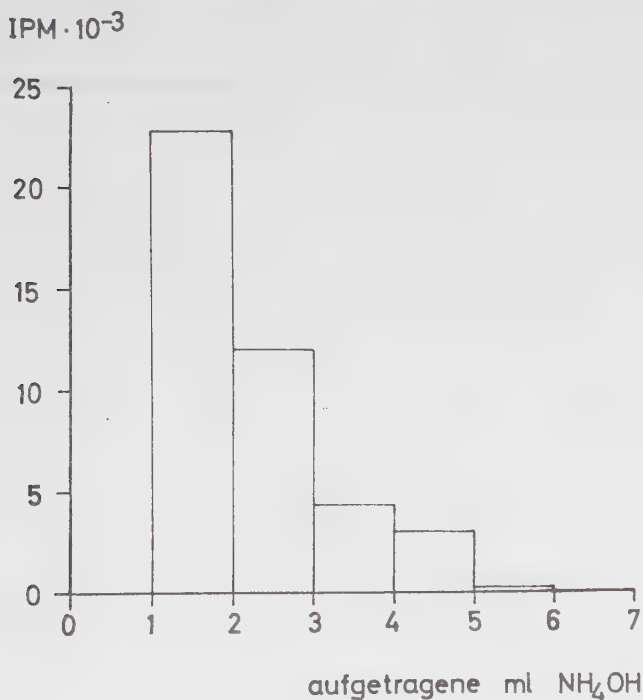


Abb.5: Elution des T_3 bzw. T_4 von der Konzentratorsäule

Nach Serumextraktion (2.2.), Abtrennung (2.3.) und Konzentrierung (2.4.) wurde ein T_3 - ^{125}I -Standard von der Bio-Rex 70-Säule mit 5 N NH_3 eluiert. Angetragen ist die Radioaktivität in den Fraktionen gegen das Volumen aufgetragener NH_3 -Lösung. Elutionskurven mit T_4 sind deckungsgleich.

2.4.2. Eindampfen der Eluate mit gleichzeitiger Dejodierung des T₃ bzw. T₄

In die Packard-Gläschen mit den Ammoniak-Eluaten wurde zur Dejodierung der eluierten Schilddrüsenhormone je ca. 5 mg kupferaktivierter Zinkstaub gegeben (5.4.2.2.) und durch vorsichtiges Umschütteln suspendiert. Die Gefäße wurden dann auf die Stopfen der eigens von uns konstruierten "Spinne" aus V2A-Stahl gesteckt und an das Einengssystem angeschlossen. Die hervorgehobenen Begriffe bei der folgenden Beschreibung dieser Apparatur finden sich in Abb.6 wieder:

Nachgereinigter Stickstoff wird nach Passage eines Vorwärmgefäßes in den oberen Teil der "Spinne" und durch deren innere Röhrchen auf 15 angeschlossene Einenggefäße im Wasserbad (75°C) geblasen. Das auf über 90°C erhitzte Gas belädt sich mit Ammoniak-Wasserdampf und strömt durch die Auslässe der "Spinne" wieder ab. In einem Kühler kondensiert der Grossteil der verdampften Flüssigkeit wieder aus, wird in einer Vorlage aufgefangen und verworfen. Der Stickstoff wird nun in Waschflaschen (je 2 parallel; im Wasserbad gekühlt) zuerst von verdünnter (ca. 7 N), dann von konzentrierter Schwefelsäure vom Ammoniakgas befreit und getrocknet und strömt am Dreizehnhahn zunächst ins Freie. Nach Füllung des Systems mit Stickstoff (nach ca. 2 min.) wird durch Umstellen des Hahnes der Gasstrom jedoch der Membranluftpumpe (Multifix M 846, A. Schwinnherr, Schwäb.Gmünd) zugeführt, die den Stickstoff von nun an im geschlossenen System umwälzt. An der Ausgangsseite der Pumpe werden unter dem Druck von etwa 40 cm Wassersäule des "Überdruckventils" eventuelle Verluste an Stickstoff automatisch

ausgeglichen. Durch diesen Überdruck, der sich auf das ganze System erstreckt, kann bei kleinen Undichtigkeiten vor allem an der Verbindung Einengglas-Stopfen-"Spinne" keine Luft und damit bei der chemischen Jodbestimmung störende Verunreinigungen angesaugt werden (5.3.3.). Sicherheitshalber bauten wir noch ein Unterdruckventil und Leerflaschen ein.

Mit dem beschriebenen System wurden jeweils 15 Proben à 5 ml 5 N NH_4OH in 10 bis 15 Minuten schonend und vor allem praktisch ohne Verluste zur Trockne eingedampft.

Die Gläser mit dem trockenen Rückstand konnten nun mit Parafilm^R verschlossen evtl. einige Tage aufbewahrt werden, ohne dass wir eine Veränderung der späteren Messergebnisse feststellen konnten, im allgemeinen jedoch wurden sie gleich der Mikrojodbestimmung zugeführt (2.5.3.1.).

2.5. CHEMISCHER JODNACHWEIS

2.5.1. Prinzip AutoAnalyzer-System

Unsere Methode zur chemischen Jodbestimmung wurde in Anlehnung an die $PB^{127}I$ - Bestimmung und ähnliche Systeme nach dem AutoAnalyzer-Prinzip der Fa. Technicon, Frankfurt, aufgebaut (5.4.1.2.; 31,32,33).

Das Kernstück einer solchen Anlage bildet eine Schlauchpumpe, über deren verschiedene Kanäle die einzelnen Analysenlösungen angesaugt und miteinander vermischt werden. In diesen stetig fliessenden Reagenzienstrom werden durch einen automatischen Probennehmer im Wechsel die einzelnen Proben oder Waschlösung eingespeist. Zugepumpte Luft trennt als gleichmässiges Blasenmuster das ganze Analysengemisch in kleine Portionen auf. Dadurch wird erstens eine Verschleppung von Probe zu Probe vermieden, zum anderen werden die Einzelportionen in vertikal angeordneten Mischschlangen gut durchmischt. Da - durch die Wahl verschieden dimensionierter Pumpenschläuche festgelegt - in der Zeiteinheit konstant bestimmte Volumina gefördert werden, erreichen die einzelnen Portionen nach einer konstanten Zeit das jeweilige Bestimmungsgerät, im vorliegenden Fall nach Durchlaufen von Verzögerungsschlangen im Heizbad ein selbstregistrierendes Photometer. Der ganze Aufbau der Versuchsanordnung zur automatischen Mikrojodbestimmung ist im Schema der Abb.7 zusammengefasst; die in der folgenden Beschreibung (2.5.2.) hervorgehobenen Begriffe finden sich dort wieder.

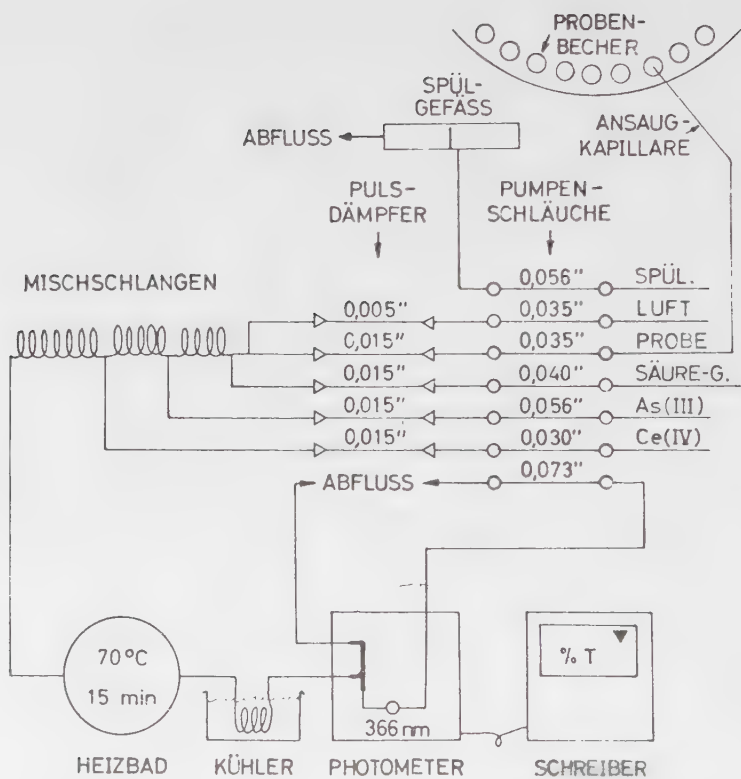


Abb.7: Fliessdiagramm bei der automatischen Mikrojodbestimmung nach dem AutoAnalyzer-Prinzip.

Angabe von Innendurchmessern der Schläuche in Zoll. Erklärung siehe 2.5.2.

2.5.2. Aufbau und Funktion der Apparatur (Abb.7)

2.5.2.1. Probennehmer (Fa.Technicon, Frankfurt)

Bei einer Frequenz von 30 Proben/Stunde tauchte die Ansaugkapillare eine Minute in jedes Probenbecherchen (AutoAnalyzer-Cups), die übrige Zeit verweilte sie in dem Spülgefäss mit 1 N NaOH. Diese Zeiten, die durch eine Nockenscheibe festgelegt waren, nützten die schliesslich vorgelegten Probenvolumina (2.5.3.1.) gut aus; es wurden jeweils ca. 0,60 ml angesaugt, die Verschleppung in die nächste Probe blieb unter 2 %.

2.5.2.2. Proportionierpumpe

Hier bewährte sich eine 13-Kanal Schlauchpumpe der Fa. Ismatec, die, am Blasenmuster ersichtlich, sehr gleichmässig und gut reproduzierbar förderte, nicht zuletzt dadurch unterstützt, dass wir das feine Pulsieren durch mehrere Pulsdämpfer (Kapillarschläuche und eigens gefertigte Windkessel) fast vollständig unterdrücken konnten.

Den angesaugten 0,6 ml Probe (im Wechsel aus den Probenbecherchen oder dem Spülgefäss; vgl. 2.5.2.1.) wurden in der Minute 0,6 ml Säuregemisch, 1,2 ml arsenige Säure und schliesslich 0,32 ml der kräftig gelbgefärbten Cer(IV)-ammoniumsulfatlösung zugespeist (Reagentien s.u.6.4.). Die zugepumpte Luft (0,32 ml/min) trennte als gleichmässiges Blasenmuster - der Zusatz eines Netzmittels in der arsenigen Säure verhütete ein Hängenbleiben oder Zerreißen der Blasen - das ganze Analysengemisch in

kleine Portionen von etwa 0,1 ml auf, bevor es mehrere Mischschlangen aus Glas durchlief. Zum Spülgefäss am Probennehmer wurde kontinuierlich frische Spüllösung (1 N NaOH, 1,2 ml/min) gepumpt, ein Überschuss wurde über einen Überlauf des Vorratsgefässes verworfen. Über einen weiteren Pumpenkanal wurde ein Teil des Analysengemisches (2,5 ml/min) nach Inkubation im Heizbad zur Messung durch die Durchflussküvette des Photometers gesaugt und verworfen. Der Rest des Inkubationsgemisches wurde über eine "Falle" für die Luftblasen vor der Küvette passiv abgeleitet.

2.5.2.3. Heizbad

Da die Cer-Arsenit-Reaktion ein ziemlich hoher Temperaturkoeffizient auszeichnet, liessen wir das Reaktionsgemisch durch eine ca. 20 Meter lange, horizontal im Ölbad aufgewickelte Glasschlange fliessen, worin es etwa 15 Minuten einer Temperatur von 70°C ausgesetzt war. Für Temperaturkonstanz ($\pm 0,01^\circ\text{C}$) sorgte ein elektronisch geregelter Präzisionsthermostat (Thermonix variabel, Fa. Braun, Melsungen). Einer kurzen nachgeschalteten Glasschlange (Kühlschlange) im Wasserbad (15°C) kam die Aufgabe zu, die Farblösung vor der Photometrie wieder abzukühlen. Hierdurch konnte eine deutliche Verbesserung im Sinne eines gleichmässigen und ruhigen Kurvenverlaufs erzielt werden.

2.5.2.4. Photometrie

Da die Mikrojodbestimmung automatisch im geschlossenen System zeitkonstant ablief, war es überflüssig, die Reaktion durch Zusätze wie z.B. Brucinsalze abzubrechen. Die Transmission der jetzt blassgelben Lösung wurde bei 366 nm (5.4.1.2.) im Photometer Eppendorf (Mikrodurchflussküvette; d = 10 mm) gemessen. Über eine Transmissionsstufe (Eppendorf) konnte dann kontinuierlich die resultierende Transmission von einem Schreiber (Servogor, Serva Heidelberg) aufgezeichnet werden. Der Null-Abgleich erfolgte wie üblich bei geschlossenem Lichtschacht; der 100 %-Abgleich mit fliessendem Analysengemisch, statt der Cer(IV)-ammoniumsulfatlösung wurde nur Aqua bidest. angesaugt, am Probennehmer die Spüllösung. Mit Cer-Lösung pendelte sich dann die Basislinie (0 ng I⁻) zwischen 15 und 20 % T ein.

2.5.3. Durchführung der Mikrojodbestimmung

2.5.3.1. Vorbereiten eingengter Proben

Die eingedampften Rückstände in den Einenggefässen (2.4.2.) wurden mit je 1 ml 1 N NaOH gelöst und zur Gewährleistung einer vollständigen Dejodierung mit weiteren 5 bis 10 mg kupferaktiviertem Zinkstaub versetzt. Die Gefässe wurden sogleich mit Parafilm^R dicht verschlossen und bei 37°C im Wasserbad ca. eine halbe Stunde leicht geschüttelt. Aus den Proben wurde sodann der Zinkstaub auszentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 3200). Den Rückstand entnahmen wir mit Mikroliterpipetten, wobei peinlich vermieden werden musste, das Zentrifugat aufzuwirbeln.

Die entnommenen Proben für die Bestimmung des T_3 bzw. des Leerwertes der Reagentien (vgl. 2.5.3.3.) wurden prinzipiell unverdünnt in die Probenbechergläser (2.5.2.1.) pipettiert. Die T_4 -Proben mussten jedoch wegen der meist viel höheren Jod-Konzentration entsprechend weiterverdünnt in die Bestimmung gegeben werden - gewöhnlich 1:25 in 1 N NaOH. Lagen die Messwerte nicht im optimalen Messbereich (2 bis 8 ng I^- /ml; vgl. Abb 8), mussten die Verdünnungen entsprechend variiert werden.

Zur Bestimmung der Wiederfinderate radioaktiver Standards (3.2.1.1 und 2.6.) wurde ein Aliquot am Gamma-Messplatz ausgezählt.

2.5.3.2. Jodid-Standard Eichkurve und Messung der Proben

Nach gründlichem Vorspülen des Systems mit Aqua bidest. und Stabilisierung von Heizbad und Photometer wurden die beschriebenen Reagentien angeschlossen (2.5.2.2.) und schliesslich das Photometer abgeglichen (2.5.2.4.). Wenn sich die Basislinie (15 - 20 % T) eingependelt hatte, wurden die KI-Eichstandards (6.4.) zur Erstellung der Eichkurve angesaugt, anschliessend die vorbereiteten Proben (2.5.3.1.). Zwischendurch liefen immer wieder Eichwerte zur Kontrolle und zur Markierung mit.

Mit kleinen täglichen Abweichungen erhielten wir regelmässig Eichkurven von der in Abb.3 gezeigten Qualität. An diesen konnten dann die Werte unbekannter Proben abgelesen werden.

Zum Schluss wurde das ganze System mit einer Detergenzienlösung (Mucosol^R, Fa. Merz & Co., Frankfurt) etwa 15 Mi-

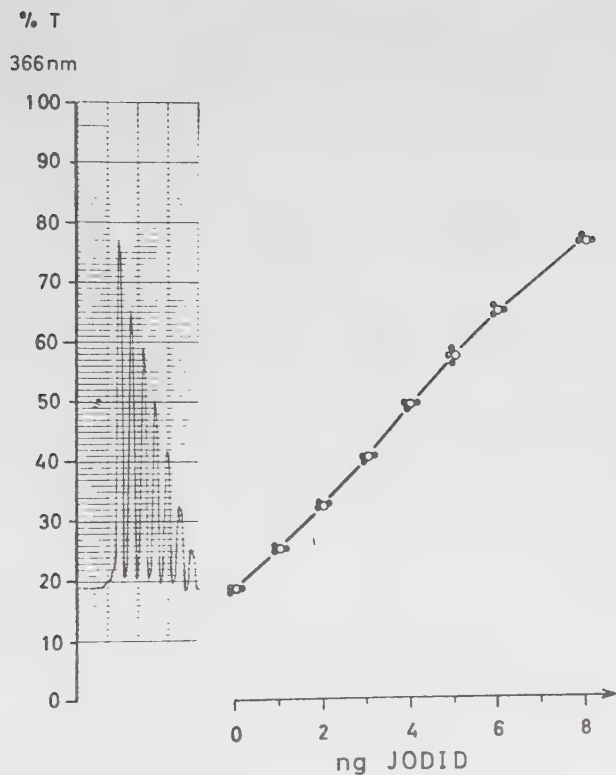


Abb.8: Eichkurve zur Mikrojodbestimmung

Der linke Teil der Abbildung zeigt eine Originalkurve von KI-Eichstandards in der automatischen Bestimmung (2.5.3.2.). Die Eichkurve ist durch die Mittelwerte (o) von Dreifachbestimmungen (●) gelegt.

nuten und dann noch mindestens 30 Minuten mit Aqua bidest. durchgespült. Die sorgfältige Pflege dieser Apparatur ist für reproduzierbare Ergebnisse essentiell.

2.5.3.3. Bestimmung des Leerwertes

Aus den Reagenzien und vorwiegend dem Konzentrierschritt ergab sich schliesslich in der Mikrojodbestimmung ein Leerwert, um den die Messwerte je nach Endverdünnung (2.5.3.1.) erhöht lagen. Die Herkunft dieses Leerwertes wird in 5.5.3. ausführlich diskutiert; er wurde für jede Messreihe mitbestimmt, indem unter Auslassung der Schritte a mit e (Abb.3) je fünf zusätzliche Konzentriersäulchen ebenso weiterbehandelt wurden, wie die ersten 25 zum Auffangen der T_3 -Eluate (vgl. ab 2.4.1.4.).

Bei Lösung der eingeeengten Eluate in je 1 ml 1 N NaOH (2.5.3.1.), also Behandlung als T_3 -Probe, lag dieser Leerwert dann im allgemeinen um 1 ng I⁻/ml, er wurde aus fünf Einzelmesswerten gemittelt und ging als x_0 in die Auswertung mit ein (2.6.). Da diese "Jodverunreinigung" den Schritten vor der Mikrojodbestimmung entstammte (5.5.3.), wurde sie bei höheren Verdünnungen, wie sie den T_4 -Proben zukam (2.5.3.1.), entsprechend mitverdünnt und war dann praktisch vernachlässigbar.

2.6. AUSWERTUNG

Zur Umrechnung der bei der Mikrojodbestimmung gefundenen Messwerte auf die jeweiligen absoluten Hormonkonzentrationen der Serumprobe diene uns folgende, sowohl für T_3 als auch für T_4 gültige Formel:

$$c_{\text{Serum}} = \frac{(x_i \cdot d - x_o) \cdot f \cdot 100}{s \cdot a \cdot b} \quad \mu\text{g/l}$$

- c_{Serum} Hormonkonzentration im Serum in $\mu\text{g/l} = \text{ng/ml}$
- x_i Der auf der KI-Eichkurve jeweils abgelesene Einzelwert einer Probe in ng I^- pro Milliliter Ansatz für die Jodbestimmung (2.5.3.2.)
- x_o Der jeweilige mittlere Leerwert der Reagenzien (2.5.3.3.).
- d Verdünnungsfaktor; für T_3 -Proben im allgemeinen $d = 1$, für T_4 -Proben $d = 25$ (2.5.3.1.).
- f Umrechnungsfaktor zur Bestimmung der Schilddrüsenhormone aus ihrem Jodgehalt. Für T_3 : $f = 1,71$, für T_4 : $f = 1,53$, da in $1,71 \text{ g } T_3$ bzw. $1,53 \text{ g } T_4$ je 1 g Jod enthalten ist.
- s Zur Bestimmung jeweils eingesetzte Serummenge in Millilitern (gewöhnlich $2,5 \text{ ml}$; vgl. 2.2.2.).
- a Jeweilige radioaktive Ausbeute in Prozent über die ganze Prozedur, die von Tag zu Tag sowohl für T_3 als auch T_4 mitbestimmt wurde (3.2.1.1.).

- b 0,96. Konstanter Regressionskoeffizient,
 gewonnen aus dem Vergleich von Hormoneich-
 kurven nach Dejodierung mit Jodideichkurven
 entsprechenden Jodgehaltes in der Mikrojod-
 bestimmung (5.4.2.4.).

Zur Berechnung konnten wir einen programmierbaren
Tischcomputer (Programma P 102, Fa. Olivetti) ein-
setzen; wir hatten u.a. ein Programm entworfen, das
nach Speicherung der Konstanten für eine Serie die ein-
gegebenen zwei I^- - Werte, die für das absolute T_3 bzw.
 T_4 eines Serums aus der Mikrojodbestimmung abgelesen
worden waren, auf Serum-Hormongehalte umrechnete und
gleichzeitig die resultierenden Quotienten T_4/T_3 aus-
druckte. Wenn nicht anders angemerkt, führten wir je-
weils Doppelbestimmungen aus.

3. ERGEBNISSE ZUR METHODE

3.1. DAS VERFAHREN IN DEN EINZELSCHRITTEN

3.1.1. Extraktionssäule (2.2.)

Auf den 25 kleinen Kationenaustauschersäulen wurde das Gesamt- T_3 und $-T_4$ aus je 2,5 ml Serum vollständig festgehalten (Abb.2a), wie durch Versuche mit radioaktiv markierten Hormonen belegt werden konnte (5.1.3.). Bei dem Waschvorgang mit 1 N KCl (Abb.2 b) blieben T_3 und T_4 fest am Austauscher, die übrigen Serumbestandteile, darunter auch I^- wurden verworfen. Der Zeitaufwand für diesen ersten Schritt betrug eine gute Stunde, währenddessen die Trennsäulen vorbereitet werden konnten. Mit 0,05 N Kaliumphosphatpuffer pH 11,9 wurden T_3 und T_4 bei Bestimmung mit den radioaktiven Isotopen zugleich in einem Volumen von ca. 8 ml zu durchschnittlich 94 % eluiert (Abb.3).

3.1.2. Trennsäule (2.3.)

Durch Aufstecken der Extraktionssäulen auf 25 Trennsäulen konnte dieses Eluat im geschlossenen System in einem relativ schmalen Peak und damit ohne zwischengeschalteten Einengschritt gleichzeitig mit der Elution auf die Trennsäule aufgetragen werden (Abb.2, c). Bei einer Höhe der Gelpackung von ca. 130 mm war die Startbande nur knapp 5 mm breit (Nachweis durch Zerschneiden der Säule). Wichtig für die Erzielung dieses schmalen Auftragspeaks war der vorherige vollständige Gegenionenaustausch von H^+ nach K^+ am Austauscherharz der

Extraktionssäule durch den oben beschriebenen Waschvorgang mit KCl. Durch Fortsetzung der Chromatographie mit dem gleichen 0,05 N Kaliumphosphatpuffer pH 11,9 wurde das T_3 , das vor dem T_4 eluiert wurde, bis zum Anstieg des Peaks um ca. 90 Minuten verzögert (Abb.2, d), die zum Packen der Konzentriersäulen usw. verwendet wurden. Das von der Extraktionssäule eluierte T_3 wurde bei Versuchen mit radioaktiv markierten Hormonen in etwa 45 ml (Elutionsdauer ca. 110 min.) vollständig wiedergefunden, T_4 danach in annähernd 60 ml (entsprechend 140 min.), vom T_3 durch ein aktivitätsfreies Intervall von 20 ml sicher getrennt (Abb.4).

3.1.3. Konzentriersäule und Eindampfen (2.4.)

Vor der Bestimmung des getrennten T_3 und T_4 war es notwendig, die Eluate in ihrem Volumen wesentlich zu reduzieren und zu entsalzen. Die kontinuierliche Ansäuerung mit Hilfe einer zweiten Schlauchpumpe erlaubte die Fortsetzung der Chromatographie im automatisierten, geschlossenen System. T_3 bzw. T_4 konnten nacheinander ohne Verluste auf zwei getrennten Kationenaustauschersäulen festgehalten werden (Abb.2,e, 5.3.2.4.). Die Chromatographie auf 25 Säulen zugleich lief so standardisiert, dass man mit großem Sicherheitsspielraum nach einem festgelegten Zeitplan arbeiten konnte: Von der 85. bis 210. Minute nach Start wurde das T_3 , von der 220. bis 370. Minute das T_4 gesammelt. War die erste Serie von Bio-Rex-Säulchen mit T_3 beladen, wurden diese sogleich weiterverarbeitet, während die Chromatographie weiterlief, und die T_4 -Frak-

tion auf der zweiten Gruppe von solchen Säulchen aufgefangen wurde, denen schliesslich die gleiche Behandlung zukam. Beim Waschen mit ca. 7,5 ml 2 N Salzsäure und ca. 15 ml Aqua bidest. pro Säulchen (Abb.2,f) blieben die Hormone fest am Austauscher gebunden (5.3.2.4.), sie konnten schliesslich mit je 4,5 ml 5 N Ammoniaklösung und einer Ausbeute von 95 % (T_3 sowie T_4) in Einenggefässe eluiert werden (Abb.2,f; Abb.5). Diese Eluate liessen sich unter rezirkulierendem Stickstoff ohne Anreicherung von Verunreinigungen und ohne Verluste an Hormonjod zur Trockne eindampfen (5.5.2.).

3.1.4. Chemische Jodbestimmung (2.5.)

Nach Wiederaufnahme der Rückstände erfolgte die Bestimmung der Schilddrüsenhormone anhand ihres Jodgehaltes nach der Cer(IV)/As(III)-Reaktion. Die zweimalige Zugabe von kupferaktiviertem Zinkstaub (1. vor dem Eindampfen zum Ammoniakeluat, 2. nach dem Eindampfen beim Auflösen in Natronlauge) stellte eine vollständige Dejodierung der Schilddrüsenhormone sicher, sodass der Jodgehalt der Proben mit T_3 oder T_4 an einer Kaliumjodidstandard-Eichkurve abgelesen werden konnte. Die Messwerte von T_3 - bzw. T_4 -Standardlösungen nach erfolgter Dejodierung ergaben beim Vergleich gegen die von KI-Standardlösungen jeweils gleichen Jodgehaltes eine Gerade mit der Regression $b=0,96$ (Korrelationskoeffizient $r=0,999$) (siehe 5.4.2.4.).

Die Empfindlichkeit der automatischen, wenig störanfälligen Mikrojodbestimmung erlaubte die Messung von 0,5 ng - 8 ng Jodid in 1 ml Ansatz. Die Reproduzierbarkeit war mit einem Variationskoeffizienten von < 5 % zufriedenstellend (31).

3.2. QUALITÄTSKONTROLLE

3.2.1. Wiederfinderversuche im Serum

3.2.1.1. Radioaktive Standards

Von Tag zu Tag wurde Kontrollserum mit radioaktiv markierten Schilddrüsenhormonen inkubiert (vgl. 6.5.3.) und über je eine der 25 Säulenkombinationen geschickt. Statt aber die schliesslich in NaOH gelösten Proben in die Mikrojodbestimmung zu geben, wurde jeweils ein Aliquot am Gamma-Messplatz ausgezählt und in Relation zu den eingesetzten Gesamtaktivitäten gebracht (2.5.3.1.). Mit diesen täglichen Wiederfinderaten wurden die gemessenen T_3 - bzw. T_4 -Spiegel unbekannter Serumproben korrigiert (Faktor a in 2.6.). Die Auswertung einer Kontrollkarte über 15 Versuchstage (Abb. 9) ergab für T_3 eine Ausbeute von $86,7 \pm 4,9 \%$, für T_4 $88,4 \pm 4,1 \%$.

3.2.1.2. Kalte Standards

Zur Bestimmung der Wiederfinderate für zugesetztes kaltes T_3 wurden zu 2,5 ml Kontrollserum je 3 ng T_3 gegeben.

Die Auswertung nach der Gesamtbestimmung ergab für 2,5 ml Kontrollserum einen T_3 - Gehalt von $3,26 \pm 0,21$ ng ($N = 6$), für das mit T_3 angereicherte Serum $5,90 \pm 0,33$ ng T_3 ($N = 4$). Aus der mittleren Differenz von 2,64 ng T_3 errechnet sich in Übereinstimmung zu den mit radioaktiv markiertem Hormon gefundenen Werten eine Ausbeute von 88 %. Korrigiert mit der Formel in 2.6., nach der unbekannte Serumproben berechnet wurden, ergab sich so eine Wiederfinderate von $102 \pm 7 \%$.

3.2.2. Wiederfinderversuche ohne Serum

Bei Chromatographie von radioaktiven oder kalten T_3 - oder T_4 -Standardlösungen über das ganze System ohne vorherige Seruminkubation wurden praktisch die gleichen Resultate mit etwas geringerer Streuung erzielt.

3.2.2. Zuverlässigkeit

Eine statistische Qualitätskontrolle ermöglicht es, auf einfache Weise die Zuverlässigkeit von Analysenergebnissen zu überprüfen und zu belegen. Zuverlässigkeit ist bei der Qualitätskontrolle der Oberbegriff für Präzision und Richtigkeit (9).

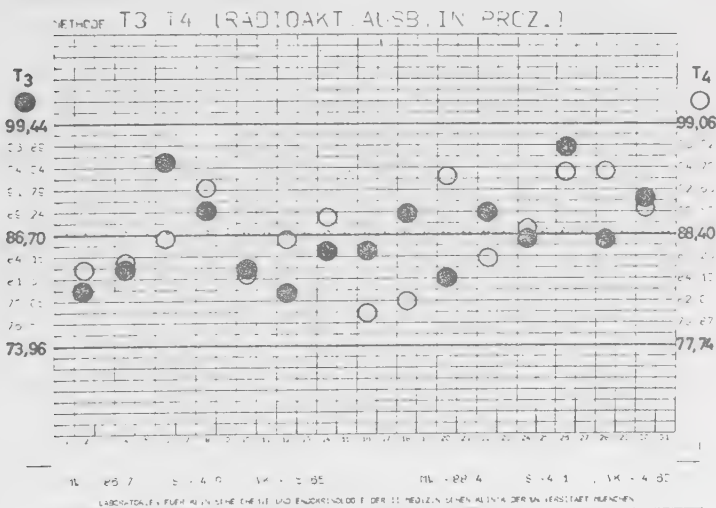


Abb. 9: Kontrollkarte zur Wiederfinderate

Eingetragen sind die Wiederfinderraten von Tag zu Tag von T_3 - ^{125}I (●) und T_4 - ^{125}I (○). Erklärung siehe 3.2.1.1.

3.2.3.1. Präzision

Die Präzision der Methode von Tag zu Tag wurde mit einem gepoolten Kontrollserum überwacht, wofür gleichfalls eine Kontrollkarte angelegt wurde (Abb.10). Der mittlere T_3 -Gehalt betrug $145,0 \pm 14,1$ ng / 100 ml, für T_4 fanden wir $5,58 \pm 0,38$ µg / 100 ml (N = 16). Der Variationskoeffizient lag somit folglich unter 10 % für T_3 , für T_4 unter 7 % und bewegte sich damit in einem Bereich, den man auch anderen vergleichbaren klinisch-chemischen Bestimmungen zugesteht. Erwartungsgemäss war die Präzision in der Serie der von Tag zu Tag wesentlich überlegen, wir fanden für 23 gleichzeitige Bestimmungen Variationskoeffizienten von 6,5 % für T_3 und 2,7 % für T_4 .

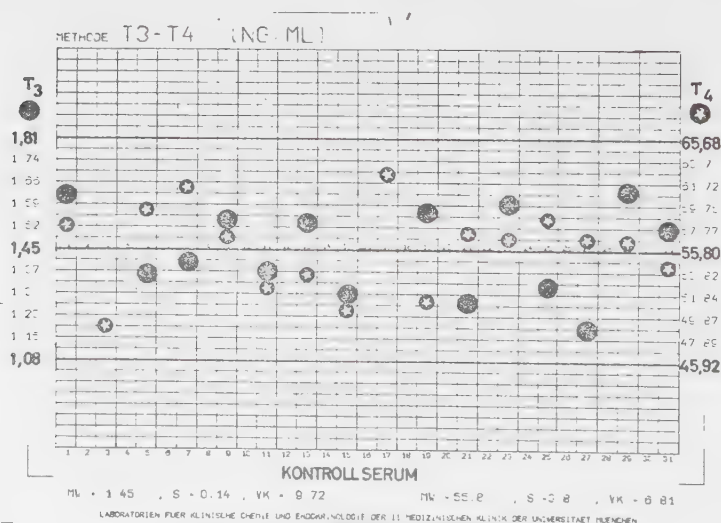


Abb. 10: Karte zur Präzisionskontrolle der Methode
 Eingetragen wurden die gemessenen T_3 - bzw. T_4 -Absolutspiegel eines von Tag zu Tag mitbestimmten Kontrollserums. Erklärung siehe 3.2.3.1.

3.2.3.2. Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit benötigt man streng genommen ein Kontrollserum, bei dem die Sollwerte zuvor mit der gleichen Testmethode ermittelt wurden, da die Ergebnisse verschiedener Methoden nicht selten beträchtlich voneinander abweichen können (9). Unsere Methode ist neu, ein solches Serum mit vorgegebenen Sollwerten stand also nicht zur Verfügung. Die Richtigkeit der Methode konnte deshalb nicht in der gleichen Art und Weise wie die Präzision von Tag zu Tag überwacht werden. Auch mit der Bestimmung einer Serumverdünnungskurve konnte die Richtigkeit nicht ausreichend überprüft werden, da die verdünnten Serum- T_3 -Spiegel nicht genügend weit von der unteren Nachweisgrenze (Definition: Null-Wert + 3s) der Bestimmung entfernt lagen.

Stattdessen erstellten wir T_3 -Lichkurven mit und ohne Zusatz von Kontrollserum, indem wir einmal steigende Mengen von T_3 in Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und zum anderen 2 ml Kontrollserum mit gleich steigenden Mengen T_3 angereichert der ganzen Prozedur unterzogen. Das Ergebnis ist in Abb. 11 aufgezeichnet, in der die unkorrigierten Messwerte aus der Mikrojodbestimmung (x_1 in 2.6.) für wiedergefundenes T_3 den jeweils zugesetzten Mengen T_3 gegenübergestellt sind. Die resultierende Wiederfindungskurve steigender Mengen T_3 ohne Serum ergibt annähernd eine Gerade mit dem Regressionskoeffizienten $b = 0,842$ und dem Korrelationskoeffizienten $r = 0,999$. Die Wiederfindungskurve aus den angereicherten Seren liegt nahezu parallel ($b = 0,875$; $r = 0,995$). Die Erhöhung aller Werte um ca. $1 \text{ ng I}^-/\text{ml}$ entspricht dem Blank der Methode (2.5.3.3).

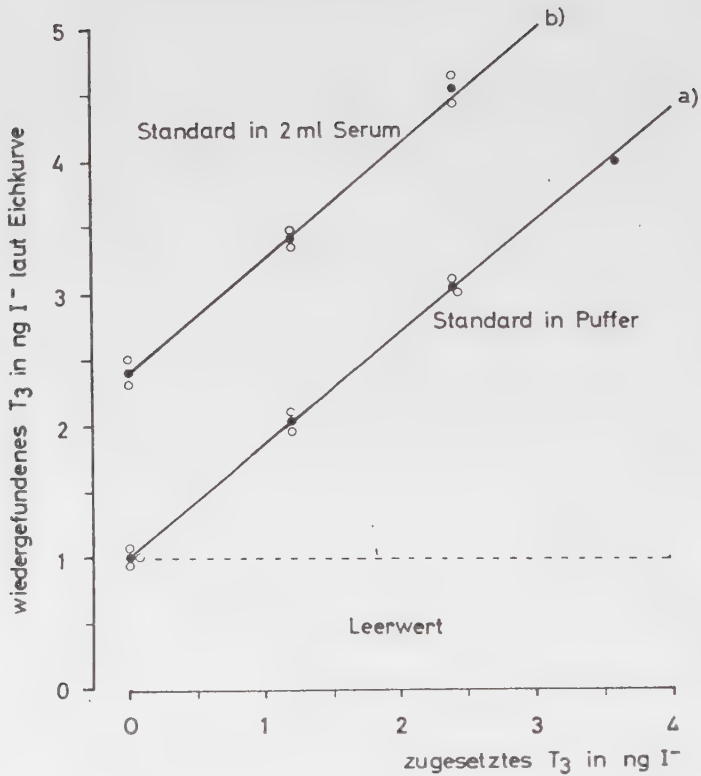


Abb. 11: Wiederfindekurven von T_3 - ^{127}I :

a) zu 2 ml Puffer, b) zu 2 ml Serum

Den eingesetzten Mengen T_3 - ^{127}I - auf den Jodgehalt bezogen - sind die gewonnenen Messwerte in der Mikrojodbestimmung auf der Ordinate gegenübergestellt. Erklärung siehe 3.2.3.2.

Der Abstand beider Geraden auf der Ordinate ergibt einen Messwert für den T_3 -Jodgehalt in den jeweils eingesetzten 2 ml Kontrollserum von 1,4 ng. Dem entsprechen 2,4 ng T_3 in 2 ml oder 1,2 ng T_3 /ml. Verglichen mit den sonst erhaltenen, nach 2.6. berechneten T_3 -Werten des Kontrollserums ($\bar{x} = 1,45 \pm 0,141$ ng/ml; siehe 3.2.3.1.) errechnet sich eine Ausbeute von 83 %, was den obigen Regressionskoeffizienten und ebenso wie diese den sonst erzielten Ausbeuten ($\bar{x} = 86,7 \pm 4,9$ %; siehe 3.2.1.) nahekommt.

Werden nun die für eingesetztes T_3 gefundenen Einzelmesswerte der Mikrojodbestimmung als x_i in die Formel nach 2.6. eingesetzt und nach dieser Umrechnung den eingesetzten T_3 -Standards gegenübergestellt, erhält man eine Wiederfinderate von $99,3 \pm 5,6\%$.

3.2.4. Spezifität und Fehlerquellen

3.2.4.1. Gegenseitige Beeinflussung der T_3 - und T_4 -Werte

Um sichergehen zu können, dass die erhaltenen T-Werte bei unserer Methode nicht durch unvollständig abgetrenntes T_4 erhöht werden, führten wir folgendes Experiment durch:

Radioaktive Standards von T_3 bzw. T_4 wurden jeweils mit 2 ml Kontrollserum inkubiert (6.5.3.). Nach Serumabtrennung und chromatographischer Auftrennung auf den ersten beiden Säulen (2.2. und 2.3.) wurden die T_3 - bzw. T_4 -Peaks auf je 1 ml AG 50 W-X4 minus 400 mesh, anstatt auf Bio-Rex 70-Säulchen festgehalten (2.4.1.3. und 5.3.2.4.). Sonst blieben alle Versuchsbedingungen unver-

ändert (Abb.2 a) bis e)). Diese Säulchen wurden nun wieder als Säulen I (2.2.3. und 2.3.2.) bei der anschliessenden Rechromatographie verwendet, wobei die T_3 - und T_4 -Peaks wiederum auf 1 cm³ - AG 50-Säulchen konzentriert und sogleich, d.h. ohne vorherige Elution am Gammamessplatz gemessen wurden. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 zusammengestellt und werden im Folgenden erläutert.

3.2.4.1.1. Rechromatographie von T_3 -¹²⁵I (Abb.12,a)

Von der eingesetzten Gesamtaktivität des T_3 -¹²⁵I-Standards ($> 6 \cdot 10^5$ IPM) erwiesen sich 2,1 % als Jodid-Verunreinigungen (vgl.3.2.4.3.), 0,99 % fanden sich im T_4 -Peak. Das nunmehr "gereinigte" T_3 konnte in der anschliessenden Rechromatographie mit 91,7 % Gesamtausbeute im T_3 -Areal wiedergefunden werden, 0,25 % wurden wiederum im T_4 -Bereich gemessen. Hierbei handelt es sich sicher nicht um eine tatsächliche Verunreinigung des T_3 -Standards mit T_4 , sondern wie auch bei den 0,99 % in der ersten Chromatographie offensichtlich um verschlepptes T_3 . Bei der Messung von T_4 im Serum fällt dieser kleine Anteil nicht ins Gewicht, da ja die T_4 -Gehalte immer um ein Vielfaches über den T_3 -Werten liegen.

3.2.4.1.2. Rechromatographie von T_4 -¹²⁵I (Abb.12,b)

Von der eingesetzten Radioaktivität des T_4 -¹²⁵I-Standards ($> 6 \cdot 10^5$ IPM) konnten 1,6 % als Jodid-Anteil (vgl. 3.2.4.3.) abgetrennt werden. Die Aktivität, die sich bei der ersten Chromatographie im T_3 -Bereich fand, konnte

Abb. 12 a) RECHROMATOGRAPHIE VON $T_3 - {}^{125}I$

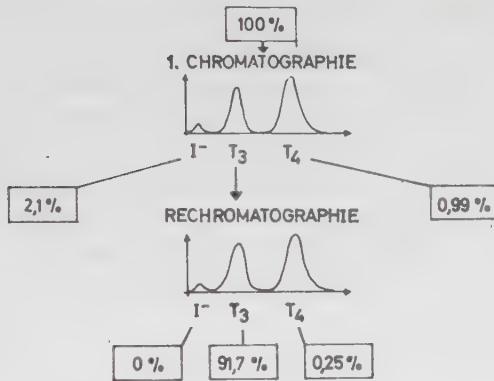


Abb. 12 b) RECHROMATOGRAPHIE VON $T_4 - {}^{125}I$

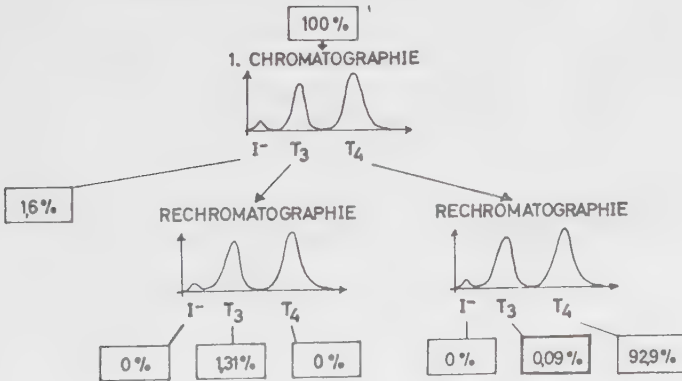


Abb.12: Schema zur Überprüfung der Abtrennung des T_3 vom T_4 im Rechromatographieversuch.

Erklärung siehe 3.2.4.1.

in der Rechromatographie als tatsächliche T_3 -Verunreinigung des T_4 -Standards identifiziert werden (1,31 %). Die Rechromatographie des T_4 -Peaks aus der ersten Chromatographie ergab eine Gesamtausbeute von 92,9 %, jetzt fanden sich nur noch 0,09 % im T_3 -Bereich. Auf Serumverhältnisse übertragen würde das bei einem durchschnittlichen molaren Verhältnis von T_3 zu T_4 von 1 zu 44 (4.2.1.) eine fehlerhafte Erhöhung der T_3 -Werte um nur etwa 4 % bedeuten.

3.2.4.1.3. Chromatographie von T_4 - ^{127}I

In einem weiteren Versuch unterzogen wir 350 ng T_4 einer frisch bereiteten kalten Standardlösung ohne vorherige chromatographische Reinigung dem gesamten Verfahren und konnten danach keine messbaren Anteile im T_3 -Peak feststellen. Bei einer wie üblich zur Bestimmung eingesetzten Serummenge von 2,5 ml (2.2.2.) entspräche dieser Standard mit ungerechnet 14 μg T_4 in 100 ml den T_4 -Serumspiegeln von hyperthyreoten Patienten (4.2.3.).

3.2.4.2. Beeinflussung der T_3 -Spiegel durch Jodtyrosine

Die Hormonvorstufen MIT und DIT, die auf der ersten Säule festgehalten und auf die Trennsäule zusammen mit den Hormonen eluiert werden, erscheinen deutlich vor dem T_3 -Peak und werden somit verworfen (Abb.13).

IPM · 10⁻³

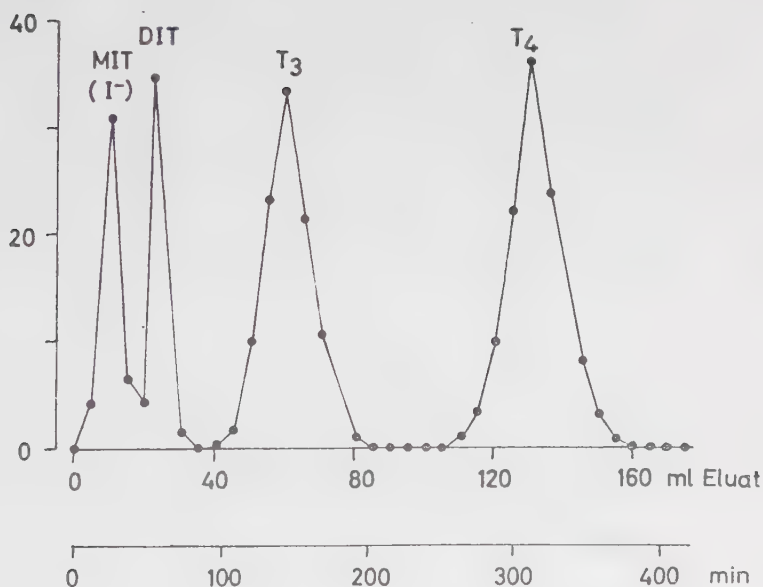


Abb.13: Chromatographisches Verhalten von MIT und DIT
bei der T₃-T₄-Trennung.

Gezeigt sind die Elutionskurven von radioaktivem MIT, DIT, T₃ und T₄ (vgl. Abb.4) nach Extraktion aus dem Serum (2.2.) und simultaner Chromatographie auf der Trennsäule (2.3.). Erklärung siehe 3.2.4.2.

3.2.4.3. Störung durch anorganisches Jodid

Das anorganische Jodid des Serums wird nicht an dem Kationenaustauscher der Extraktionssäule festgehalten, es wird zusammen mit den Serumproteinen beim Waschvorgang mit Kaliumchloridlösung eluiert und verworfen. Auf die Trennsäulen aufgetragen, läuft es bei der Chromatographie mit MIT vorneweg (Abb.13).

3.2.4.4. Störung durch exogene Jodkontamination

Auch einige mit exogenem Jod verseuchte Seren versuchten wir mit unserer Methode zu bestimmen. Es zeigte sich insbesondere nach frischer Applikation von jodhaltigen Kontrastmitteln (Urografin, Biligrafin), die sich in exzessiv hohen PBI-Werten bemerkbar machten, eine deutliche Erhöhung der dann bestimmten T_3 - Werte gegenüber den Werten vor Medikation, während die T_4 -Werte praktisch gleich blieben. Offensichtlich wurde eine geringe Menge der jodhaltigen "Verunreinigungen" doch noch zusammen mit T_3 aufgefangen, obwohl der Hauptanteil zusammen mit den Serumproteinen bereits von Säule I ausgewaschen und verworfen werden konnte.

3.2.4.5. Tetrac

Kalte Tetrajoäthyoessigsäure, eine desaminierte Abbaustufe des T_4 , mit der wir Serumproben versetzt hatten, wurde zusammen mit T_4 eluiert.

4. KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN

4.1. METHODIK

4.1.1. Auswahl der Probanden

In der Bemühung um Objektivität wurde mir lediglich Blut oder Serum in codierten Probenröhrchen geliefert, sodass mir anfangs weder die Patienten noch deren Krankheiten bekannt waren. Erst als die Ergebnisse genügend vieler Bestimmungen vorlagen (im allgemeinen Doppelbestimmungen), verglichen wir unsere Ergebnisse mit den Resultaten der konventionellen Schilddrüsen-funktionsdiagnostik (4.1.3.) und den Krankengeschichten. Zur Bestimmung der Absolutspiegel von T_3 und T_4 mit der beschriebenen Methode wurden die gleichen Seren wie zum T_3 - in vitro - Test und zur Bestimmung des $PB^{127}I$ verwendet.

4.1.2. Die klinische Beurteilung des Krankheitsbildes

Bei der klinischen Beurteilung des Schilddrüsenfunktionszustandes der Patienten gingen wir im Wesentlichen nach dem von CROOKS (6) und BILLEWICS (13) erstellten "Diagnostischen Index" vor (66). Dieser stellt einen Katalog verschiedener Symptome mit der jeweiligen diagnostischen Wertigkeit dar und ist getrennt aufgestellt für Über- und Unterfunktion der Schilddrüse.

4.1.3. Konventionelle Schilddrüsenfunktionsdiagnostik

Der klinischen Beurteilung des jeweiligen Krankheitsbildes folgte die Abklärung mit Hilfe der konventionellen Methoden zur Schilddrüsen-Funktionsdiagnostik (Tab.1).

Tabelle 1: Konventionelle Methoden der Schilddrüsen-funktionsdiagnostik

1. Schilddrüsenhormonspiegel im Serum:
Proteingebundenes Jod (PB^{127}I),
Gesamthyroxin (kompetitive Protein-Bindungsanalyse)
2. Prozentuale Bindung an Serumproteine:
 T_3 -in vitro-Test,
dialysierbares T_4
3. Absoluter freier Schilddrüsenhormonspiegel:
Produkt von je einem Resultat aus 1. und 2.,
z.B. aFT_4 oder "Index der freien Schilddrüsenhormone"
4. Radiojodspeicherungskurve (^{131}I , ^{132}I):
Speicherungshöhe bzw. Initialanstieg, Radiojodumsatz, T_3 -Suppressionstest, TSH-Stimulationstest.
5. Szintigraphie (^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$):
Ggf. mit T_3 -Suppression, TSH-Stimulation
6. Methoden zur Erfassung der peripheren Wirkung der Schilddrüsenhormonspiegel:
Grundumsatz, Serumcholesterin, ASR-Zeit

Bei jedem Patienten wurden zum Vergleich mit den von uns gemessenen T_3 - und T_4 -Absolutwerten folgende Bestimmungen durchgeführt:

4.1.3.1. PE¹²⁷I

Zur Bestimmung des proteingebundenen Jods im Serum bedienen wir uns der Technicon-PBI-AutoAnalyzer-Einheit mit einigen Modifikationen (33, 32). Dabei wurde Serum ohne jede Vorbehandlung (wie z.B. Proteinfällung oder Filterung über Ionenaustauscher) nach nasser saurer Veraschung mit Hilfe der Cer(IV)/As(III)-Reaktion auf seinen Gehalt an I^- untersucht. Streng genommen liegt also eine Gesamt-Jod-Bestimmung im Serum vor; an der Bezeichnung PE¹²⁷I-Bestimmung wurde jedoch festgehalten, um Begriffsverwirrungen zu vermeiden.

Von verschiedenen möglichen Störfaktoren abgesehen (66, 33), spiegelt dieser Test recht zuverlässig den Hormonjodgehalt des Serums wider. Vor allem können Hyperthyreosen sehr gut abgegrenzt werden, während Hypothyreosen in ca. einem Viertel der Fälle noch in den unteren Normalbereich fallen (66).

Der für unser Labor gültige Normalbereich liegt zwischen 3,1 und 6,8 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ($\bar{x} \pm 2\text{ s}$).

4.1.3.2. T_3 -in vitro-Test

Dieser Test liefert Informationen über den Sättigungsgrad der Schilddrüsenhormon-Transportproteine im Serum. Bei Inkubation von radioaktiv markiertem T_3 mit Serum verteilt sich die Radioaktivität zwischen den schilddrü-

senhormonbindenden Serumeiweißkörpern und zugesetzten Akzeptoren; bei unserer Methode wird Dextrangel eingesetzt (35). Je mehr endogenes Hormon also vorhanden oder je niedriger die Transportkapazität der Serumeiweiße ist, desto mehr zugesetzte radioaktiv markierte T_3 -Moleküle werden an das konkurrierende Dextrangel adsorbiert. Dieses sog. freie T_3 wird in Prozent der eingesetzten Aktivität angegeben ($\% f T_3$).

Der für unser Labor gültige Normalbereich liegt zwischen 32,0 und 42,0 % ($\bar{x} \pm 2 s$).

4.1.3.3. Index der freien Schilddrüsenhormone

Durch einfache Multiplikation der Messwerte von $PB^{127}I$ und T_3 -in vitro-Test lässt sich dieser Index berechnen, der in den meisten Fällen eine Aussage erlaubt über den absolut freien Schilddrüsenhormonspiegel, welcher biologisch direkt wirksam und diagnostisch am interessantesten ist. Bei euthyreoter Stoffwechsellaage während einer Schwangerschaft, Östrogen-Medikation und unter Antiovalantien z.B. findet man aufgrund erhöhter TBG-Spiegel hohe Werte im $PB^{127}I$ gegenüber einem niedrigen Anteil im T_3 -in vitro-Test. Der Index jedoch fällt normal aus, er kann diese proportionierte Verschiebung wieder ausgleichen und erlaubt damit eine richtige Beurteilung der wahren Verhältnisse (66).

Normbereich: 1,33 - 2,5 $\mu g/100 ml$. Ind. =
$$\frac{PB^{127}I \cdot \% f T_3}{100};$$

4.2. KLINISCHE ERGEBNISSE

4.2.1. Normalkollektiv

Bei Untersuchung eines Kontrollkollektivs von schilddrüsengesunden Probanden (vorwiegend Klinikpersonal: keine Medikation, Gravidität und Dysproteinämie ausgeschlossen) fanden sich die in Tab. 2 einem Kollektiv von Strumaträgern (4.2.2.) gegenübergestellten Werte.

Der mit der vorgestellten Methode bestimmte durchschnittliche absolute T_3 -Gehalt in den Seren des Normalkollektivs lag bei 146 ± 20 ng/100 ml ($\bar{x} \pm s$).

Die absoluten Spiegel des T_4 lagen bei $7,65 \pm 1,07$ µg/100 ml und zeigten im Einzelnen eine gute Übereinstimmung mit den Werten des $PE^{127}I$ (TBL. 14).

Das aus den Einzelquotienten gemittelte Verhältnis $T_3 : T_4$ betrug ca. 1 : 51 auf Gewichtsbasis bzw. 1 : 44 auf molarer Basis.

Die Werte des $PE^{127}I$ und des T_3 -in vitro-Tests im Normalkollektiv deckten sich hierbei gut mit dem sonst für unsere Klinik gültigen Normalbereich (4.1.3.).

In Abb. 15 finden sich die einzelnen absoluten T_3 -Werte gegen die jeweils zugehörigen absoluten T_4 -Werte aufgetragen. Das Rechteck entstand aus der Überschneidung der beiden Bereiche der doppelten Standardabweichung, mit der die Einzelwerte um den Mittelwert streuen. Eine Normalverteilung angenommen, beinhalten diese Bereiche ($\bar{x} \pm 2 s$) 95 % der Normalwerte, oder anders ausgedrückt: Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Wert, der nicht in diesen Bereich, sondern ausserhalb fällt, einen Normalwert darstellt, ist sehr gering (2 %).

Der aus den gefundenen Werten errechnete Korrelations- bzw. Regressions-Koeffizient ($r = -0,07$ bzw. $b = -0,01$) macht wie Abb. 15 deutlich, dass die absoluten T_3 - und T_4 -Spiegel im Normalkollektiv praktisch unabhängig voneinander variierten.

		NORMALPERSONEN ($\bar{x} \pm 2s$; N=23)	BLANDE STRUMA ($\bar{x} \pm 2s$; N=43)	SIGNIFIKANZ
T_3	ng/100ml	146 ± 20	171 ± 41	$p < 0,005$
T_4	$\mu\text{g}/100\text{ml}$	$7,65 \pm 1,07$	$6,19 \pm 1,42$	$p < 0,0005$
$T_3:T_4$	$\frac{\text{ng}}{\mu\text{g}}$	$19,6 \pm 4,1$	$28,8 \pm 8,9$	$p < 0,0005$
$T_3:T_4$	$\frac{\text{Mol}}{\text{Mol}}$	$1 : 43,9$	$1 : 30,3$	$p < 0,0005$
PB^{127}I	$\mu\text{g}/100\text{ml}$	$5,77 \pm 0,62$	$4,74 \pm 1,11$	$p < 0,0005$
$\% \text{ f } T_3$		$34,77 \pm 4,03$	$33,73 \pm 4,63$	n.s.
Index ($\text{PB}^{127}\text{I} \cdot \% \text{ f } T_3$)	$\mu\text{g}/100\text{ml}$	$1,98 \pm 0,26$	$1,60 \pm 0,40$	$p < 0,0005$

Tab. 2: Gesamtspiegel von T_3 und T_4 sowie $T_3:T_4$ -Verhältnis im Serum bei Normalpersonen und Patienten mit blander Struma.

Verglichen sind zusätzlich die Werte aus der Bestimmung des PB^{127}I und dem T_3 -in vitro-Test. Erklärung siehe 4.2.1. und 4.2.2.

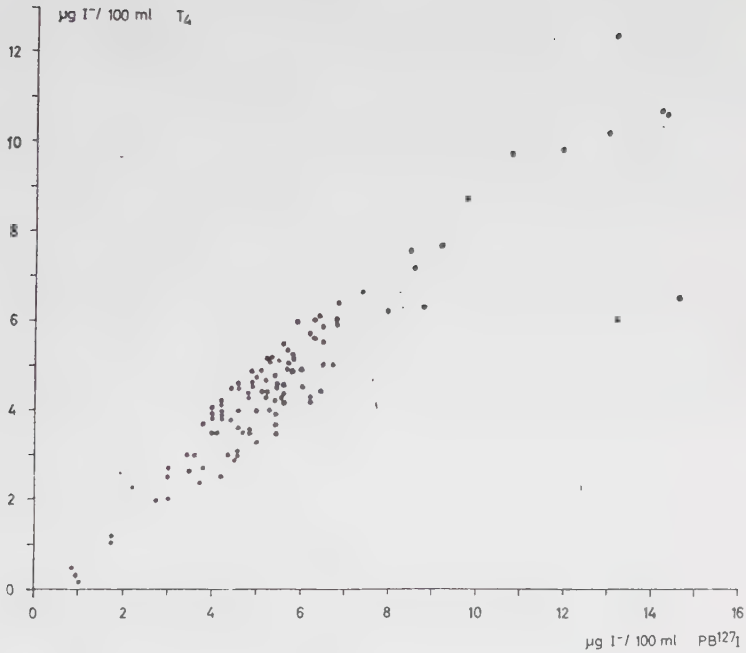


Abb.14: Vergleich von absolutem T_4 und $PB^{127}I$

Den Einzelwerten aus der $PB^{127}I$ -Bestimmung sind die mit der vorliegenden Methode bestimmten absoluten T_4 -Spiegel (auf den Jodgehalt umgerechnet) im Serum aller Patienten der Experimentalserie gegenübergestellt.

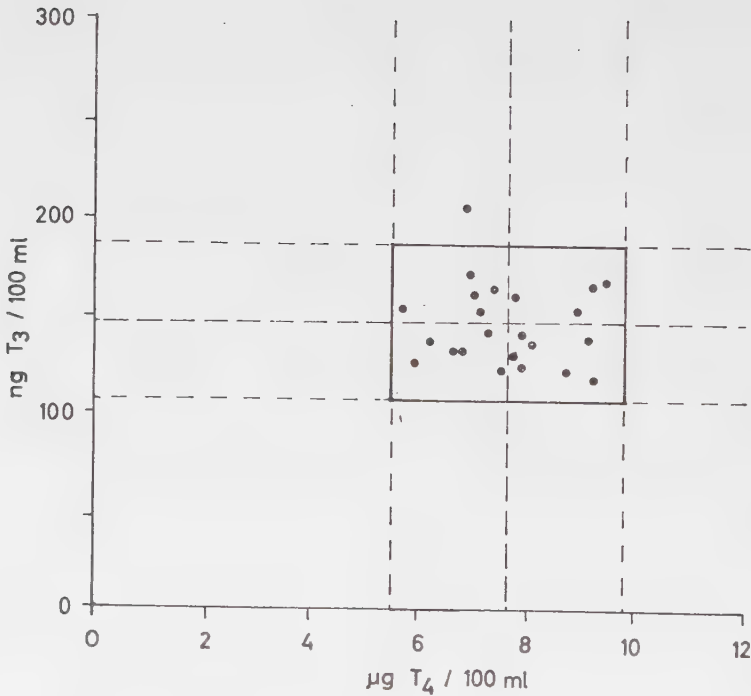


Abb.15: T_3 - und T_4 -Absolutspiegel im Normalkollektiv.

Aus den eingetragenen Einzelwerten von schilddrüsen-gesunden Kontrollpersonen wurden die jeweiligen Normalbereiche ($\bar{x} + 2s$) berechnet und angegeben. Aus der Überschneidung beider Bereiche ergibt sich ein Rechteck, das die Normalwerte sowohl für T_3 als auch T_4 beinhaltet. Dieser Bereich wurde in die Abb. 16 und 17 zum Vergleich übertragen.

4.2.2. Blande Strumen

Das Ergebnis einer Bestimmung der Gesamtspiegel von T_3 und T_4 im Serum von 43 Patienten mit blander Struma (66, 39, 49) ist in Abb. 16 zusammengestellt. Man erkennt neben dem Rechteck, das den Normalbereich für T_3 und T_4 der euthyreoten Kontrollgruppe angibt ($\bar{x} \pm s$; vgl. Abb. 15), die individuellen T_3 - und T_4 -Serumwerte von Patienten mit blander Struma. Dabei sind die Fälle nach Struma und Rezidivstruma diffusa und nodosa aufgeschlüsselt.

Die T_4 -Einzelwerte der Strumapatienten liegen in der unteren Hälfte des Normalbereichs oder noch etwas darunter. Im Gegensatz dazu erscheinen die T_3 -Spiegel normal oder leicht erhöht. Verglichen nach dem Student-t-Test für unverbundene Stichproben ergab sich, dass die T_4 -Spiegel im Mittel gegen das Normalkollektiv signifikant erniedrigt sind ($p < 0,0005$), während die T_3 -Spiegel signifikant erhöht sind ($p < 0,005$). Dementsprechend signifikant sind die Quotienten T_3/T_4 bei den Kropfpatienten im Verhältnis zu den Normalpatienten erhöht.

Diese Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefasst. Darüber hinaus findet sich dort eine Gegenüberstellung der zugehörigen Werte aus der PBI-Bestimmung und dem T_3 -in vitro-Test sowie das Produkt aus diesen beiden Bestimmungen, der sog. Index der freien Schilddrüsenhormone. Die Patienten im Struma-Kollektiv wiesen im Mittel niedrigere Werte des PBI und des T_3 -in vitro-Tests auf (66). Zwischen den Gruppen Struma und Rezidivstruma diffusa und nodosa liess sich kein Unterschied erkennen. Die absoluten T_3 - und T_4 -Spiegel variierten im Strumakollektiv ähnlich unabhängig voneinander (Korrelationskoeffizient $r = 0,31$; Regressionskoeffizient $b = 0,09$) wie im Normalkollektiv (4.2.1.). Das gleiche gilt,

wenn man beide Gruppen zu einem Kollektiv klinisch euthyreoter Personen zusammenschliesst ($r = 0,06$; $b = 0,02$).

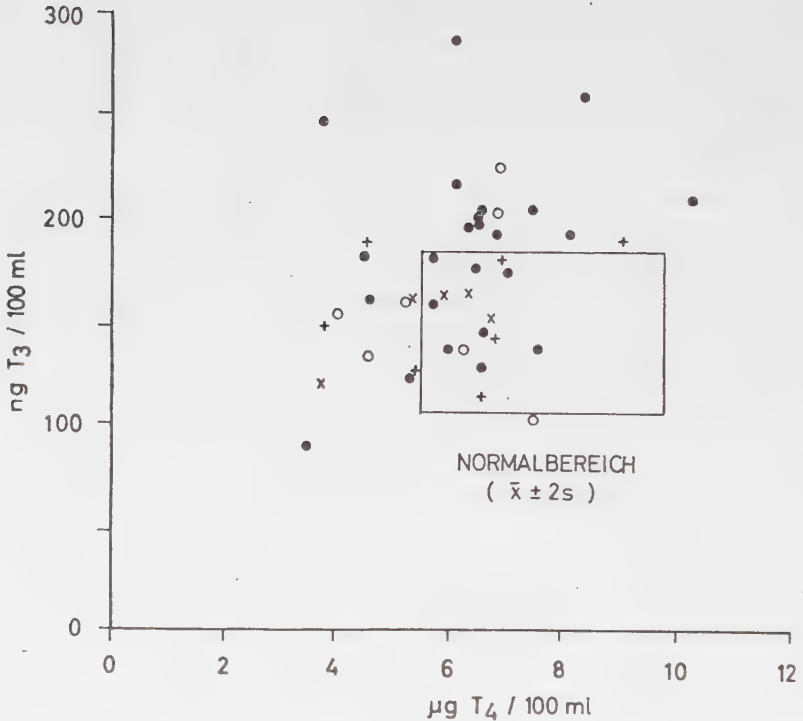


Abb.16: T₃- und T₄-Absolutspiegel bei blander Struma.

Das Rechteck zeigt den Normalbereich ($\bar{x} \pm 2s$) für T₃ und T₄ einer euthyreoten Kontrollgruppe (vgl. Abb.15). Die individuellen Werte von Patienten mit blander Struma diffusa (●) und nodosa (+) bzw. blander Rezidivstruma diffusa (○) und nodosa (x) zeigen im Vergleich dazu eine disproportionierte Erhöhung der T₃-Spiegel bei erniedrigten T₄-Spiegeln.

4.2.3. Hyperthyreosen

4.2.3.1. Klassische Form der Hyperthyreose (H. Basedow)

Untersucht wurden neun Patienten mit der Form der Hyperthyreose, welche in der bisher üblichen Nomenklatur dem Morbus Basedow entspricht (66, 39, 49). Die Bestimmung des PB^{127}I , der T_3 -in vitro-Test sowie der Index der freien Schilddrüsenhormone zeigten deutlich erhöhte Werte (Tab.3); die Diagnose war damit gesichert. Auch die Bestimmung der absoluten Hormonspiegel nach der vorliegenden Methode zeigte eine Erhöhung sowohl des T_3 als auch des T_4 (Tab. 3 und Abb.17).

Ein paralleler Abfall von T_3 und T_4 während zweiwöchiger thyreostatischer Therapie (Methylmercaptimidazol, Favistan[®]: 7 Tage 3 x 1, 7 Tage 2 x 1 Tabl.) kann in Abb. 17 an den verbundenen Werten der Patienten B.H. verfolgt werden.

4.2.3.2. T_3 -Thyreotoxikose

Die Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass es offenbar Patienten gibt, bei denen eine Schilddrüsenüberfunktion bei normalem Serum- T_4 -Gehalt und normalem TBG durch einen disproportional erhöhten Spiegel des biologisch wirksameren T_3 im Serum bedingt ist (43,48,68,69,70,76). Wir konnten die Seren einiger Patienten untersuchen, bei denen möglicherweise eine solche T_3 -Thyreotoxikose vorlag (vgl. Tab. 3 und Abb. 17):

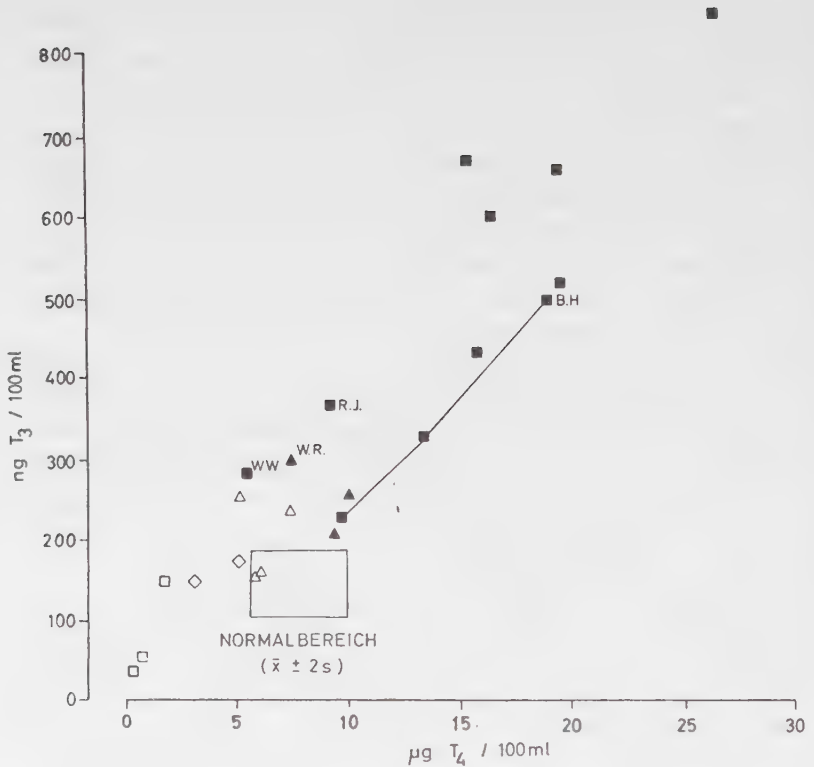


Abb.17: Gesamtspiegel von T₃ und T₄ im Serum bei Patienten mit Hyperthyreose (■), autonomen Adenomen der Schilddrüse mit (▲) und ohne (△) Hyperthyreose, sowie mit primärer (□) und sekundärer (◇) Hypothyreose.

Zum Vergleich ist der Normalbereich ($\bar{x} \pm 2s$) von T₃ und T₄ als Rechteck angegeben (vgl. Abb.15). Die Patientin B.H. mit Morbus Basedow zeigte ein paralleles Absinken der T₃- und T₄-Spiegel unter 2-wöchiger Favistan-Behandlung (vgl. 4.2.3.1.). Die Patienten R.J., W.R. und W.W. sind als Beispiele einer T₃-Thyreotoxikose angeführt (4.2.3.2.).

Kasuistik:

Der Patient R.J. war 5 Monate nach Radiojodtherapie klinisch noch deutlich hyperthyreot. Die Bestimmung des PB^{127}I und die Werte des T_3 -in vitro-Tests sowie der Index der freien Schilddrüsenhormone zeigten Normalwerte, korrelierten also keinesfalls mit dem klinischen Bild. Die Bestimmung der Absolutspiegel der Schilddrüsenhormone im Serum jedoch deckte einen weit erhöhten Wert des T_3 auf, während die T_4 -Konzentration lediglich im oberen Normbereich lag.

Der Patient W.W. kam postoperativ in eine thyreotoxische Krise, nachdem er vor der Strumaresektion wahrscheinlich unzureichend mit Favistan vorbehandelt war. Wie im vorhergehenden Fall lagen die Parameter aus PBI , T_3 -in vitro-Test und der Index der freien Schilddrüsenhormone noch im oberen Normbereich. Auch hier fand sich ein deutlich erhöhter Spiegel des absoluten T_3 im Serum, während das absolute T_4 sogar an der unteren Grenze der angegebenen Norm lag.

Der Patient W.R. litt an der Symptomatik einer Hyperthyreose, bei der Radiojoddiagnostik fand sich ein dekompenziertes autonomes Adenom der Schilddrüse (4.2.6.1.). Nach der konventionellen Schilddrüsenfunktionsdiagnostik konnte die Diagnose Hyperthyreose mit Normalwerten aus PBI , T_3 -in vitro-Test und Index der freien Schilddrüsenhormone nicht bestätigt werden. Aufgrund der deutlich erhöhten absoluten T_3 -Spiegel, gemessen mit der angegebenen Methode, handelte es sich hier um eine weitere T_3 -Thyreotoxikose.

4.2.4. Autonome Adenome der Schilddrüse

Der Szintigraphische Befund eines "heissen" Knotens, dessen Autonomie durch einen zusätzlichen T_3 -Suppressions-test bzw. TSH-Stimulationstest zu sichern ist, bedeutet noch nicht, dass der Träger auch gleich hyperthyreot sein muss. Er wird es erst dann, wenn die Summe der abgegebenen Hormone aus dem heissen Knoten und dem übrigen Schilddrüsengewebe den Bedarf des Körpers übersteigt. Wir unterscheiden also autonome Adenome der Schilddrüse ohne Hyperthyreose von solchen mit Hyperthyreose (66, 49, 51).

4.2.4.1. Autonomes Adenom mit Hyperthyreose

Bei unseren Untersuchungen fanden wir zwei leicht hyperthyreote Patienten, deren T_3 - und T_4 -Absolutwerte im Serum beide deutlich erhöht lagen (Tab. 3 und Abb.17). Die Werte dieser Patienten wären also mit den Werten der Patienten mit Morbus Basedow zu vergleichen (4.2.3.1.). Ein dritter Patient jedoch (W.R.) scheint einen Fall von T_3 -Thyreotoxikose darzustellen, er zeigte eine isolierte Erhöhung des T_3 -Absolutspiegels im Serum (4.2.3.2.).

4.2.4.2. Autonomes Adenom ohne Hyperthyreose

Bei vier Patienten mit autonomem Adenom der Schilddrüse ohne Hyperthyreose fanden sich niedrig normale T_4 -Werte bei teils normalen, teils mässig erhöhten T_3 -Spiegeln. Die gefundenen Werte wären also mit den Befunden bei Patienten mit blander Struma vergleichbar (4.2.2.).

4.2.5. Hypothyreosen

Wir konnten fünf Patienten mit primärer oder sekundärer Hypothyreose (66, 49) untersuchen und fanden bei allen deutlich erniedrigte T_4 -Absolutspiegel. Dabei konnten in drei Fällen normale, im Verhältnis zu T_4 also relativ hohe T_3 -Spiegel gemessen werden. In zwei Fällen waren jedoch auch diese weit unter die Norm abgesunken (Tab.3 und Abb. 17).

Ein Zusammenhang mit Art oder Schwere der Hypothyreosen liess sich nicht erkennen.

T_3	T_4	$\frac{T_3}{T_4}$	$PB^{127}I$	$f T_3$	Index
$\frac{ng}{100ml}$	$\frac{\mu g}{100ml}$	$\frac{ng}{\mu g}$	$\frac{\mu g}{100ml}$	%	$\frac{\mu g}{100ml}$

NORMALKOLLEKTIV

$\bar{x} \pm s$	146	7,65	19,6	5,8	34,8	1,98
	± 20	$\pm 1,07$	$\pm 4,1$	$\pm 0,6$	$\pm 4,0$	$\pm 0,26$

HYPERTHYREOSE

L.W.	845	26,44	31,9	16,0	54,0	8,64	
S.A.	665	15,53	42,8	16,8	56,0	9,41	
L.E.	655	19,48	33,6	20,0	61,4	12,28	
B.M.	600	16,52	36,3	14,4	53,1	7,64	
P.M.	515	19,65	26,2	20,0	52,0	10,40	
B.H.	494	18,88	26,2	13,2	52,2	6,89	vor Therapie
"	325	13,42	24,2	9,8	51,0	4,99	1 Wo. Favistan
"	226	9,65	23,4	8,8	38,3	3,37	2 Wo. Favistan
M.B.	428	16,42	26,0	14,4	63,9	9,20	
R.J.	364	9,21	39,5	6,8	37,6	2,56	T_3 -Thyreotoxikose
W.W.	280	5,42	51,8	5,4	42,0	2,27	T_3 -Thyreotoxikose

AUTONOMES ADENOM MIT HYPERTHYREOSE

W.R.	294	7,28	40,4	6,0	38,6	2,32	T_3 -Thyreotoxikose
H.A.	253	9,96	25,4	14,6	32,9	4,80	
H.S.	205	9,32	22,0	13,2	49,7	6,56	

AUTONOMES ADENOM OHNE HYPERTHYREOSE

D.E.	251	5,06	49,6	5,0	33,5	1,68	
R.E.	233	7,34	31,7	5,4	38,4	2,07	
S.A.	154	5,98	25,7	5,3	46,0	2,44	
S.E.	151	5,85	25,8	4,4	36,5	1,61	

HYPOTHYREOSE

M.A.	171	5,28	32,4	4,1	22,2	0,91	secundär
G.J.	149	3,03	49,1	2,7	29,2	0,79	secundär
F.M.	147	1,71	85,8	1,7	34,0	0,58	primär
G.H.	56	0,43	131,7	0,8	26,9	0,22	primär
W.G.	53	0,60	88,8	0,8	48,5	0,39	primär

Tab. 3: Die individuellen Meßwerte in den besprochenen (4.2.) Patientengruppen: Absolutes T_3 und T_4 im Serum und Quotient $T_3 : T_4$, bestimmt nach der vorliegenden Methode. Daneben das $PB^{127}I$, % $f T_3$ aus T_3 -in vitro-Test und der Index der freien Schilddrüsenhormone (=Produkt aus $PB^{127}I$ und % $f T_3$).

5. VORVERSUCHE ZUR METHODE

5.1. EXTRAKTION DER SCHILDDRÜSENHORMONE AUS DEM SERUM MIT KATIONENAUSTAUSCHERN

5.1.1. Vorüberlegungen

Eine getrennte Bestimmung der SD-Hormone T_3 und T_4 im Blut setzt deren Isolierung vom Serumeiweiss voraus, da dort der grösste Teil in unterschiedlichem Masse an spezifische Transportproteine (TBA, TDPA, TBG) gebunden ist (49,57). In dem von uns entwickelten Trennverfahren (siehe 2.3. und 5.2.) werden T_3 und T_4 mit alkalischem Kaliumphosphatpuffer auf Dextrangel aufgetrennt. Um nun diesen Trennvorgang einfach mit dem vorher erforderlichen Extraktionsschritt verknüpfen zu können, musste ein Verfahren gefunden werden, bei dem T_3 und T_4 nach der Extraktion in einem möglichst kleinen Volumen dieses Puffers vorlag, mit dem danach die eigentliche Trennung durchgeführt wurde.

Es ist bekannt, dass verschiedene nichtionische Adsorbentien und hier wiederum vor allem Dextrangel (45, 25, 62), in viel stärkerem Masse aber Ionenaustauscher (55, 25) mit den bindenden Serumproteinen um die JAS konkurrieren können. Auf geeigneten Anionenaustauschern werden die Schilddrüsenhormone im alkalischen Milieu gebunden, durch Säuren können sie wieder eluiert werden (21, 57, 25). Umgekehrt werden sie im sauren Milieu an Kationenaustauscher gebunden und können im alkalischen wieder eluiert werden (57, 25, 7). Uns bot sich also das letztgenannte Verfahren an. Wir testeten verschiedene Kationenaustauscher auf ihre Brauchbarkeit für eine Extraktion der Schilddrüsenhormone aus dem Serum und nach-

folgender Elution mit dem Trennpuffer (0,05 N Kaliumphosphatpuffer pH 11,9). Sehr bald erwies sich der stark saure Kationenaustauscher AG 50 W-X4 durch seine einfache Handhabung und quantitative Abtrennung der Jodaminosäuren aus dem Serum als besonders geeignet, wie in den folgenden Vorversuchen aufgezeigt werden soll.

5.1.2. Kontinuierliches chromatographisches Verfahren

5.1.2.1. Säulenpräparation

Als Chromatographiesäulen für diese und ähnliche (vgl. 5.3.2.1.) Vorversuche verwendeten wir handelsübliche 2 ml, 5 ml und 10 ml Einzelspritzen, auf deren "Toden" Filterplättchen appliziert waren, die wir mit einem Stopfenbohrer aus einer dreifachen Lage Glasfasermatte gestanzt hatten. Die Filterplättchen wurden dann angefeuchtet (H_2O), und schliesslich eine dünne Suspension des stark sauren Kationenaustauschers AG 50 W-X 4 minus 400 mesh (H^+ -Form) in 0,1 N HCl eingefüllt, bis - nach Absetzen des Austauschers - die gewünschte Füllhöhe erreicht war. sodann wurden die Säulen mit je mindestens dem dreifachen Bettvolumen an 0,1 N HCl gespült, nachdem sie über passende Silikongummistopfen, durchbohrt von einer Spritzenkanüle, luftdicht an die Schläuche der Proportionierpumpe (siehe 2.3.1.) angeschlossen waren.

5.1.2.2. Benötigte Menge Austauscher

Hauptsächlich, um später ein geringes Elutionsvolumen zu erreichen, sollte die Menge an benötigten Austauscher in Verhältnis zur Menge aufgetragenen Serums möglichst klein sein. Um diese Mindestmenge für eine quantitative Extraktion herauszufinden, versetzten wir T_3 -, T_4 - ^{125}I -Serum-

Inkubationsgemisch (6.5.3.) im Verhältnis 1:1 (V:V) mit 0,1 N HCl und inkubierten 30 min. bei 37°C. Mit HCl wesentlich höherer Normalität denaturiert das Serum. Davon wurden je 5 ml über Säulen mit verschiedenen Mengen Austauscher gepumpt, anschliessend wurde mit 0,1 N HCl weitergespült (0,42 ml/min.). Aus den Eluaten wurden dann die Radioaktivitäten bestimmt und in Relation zu der jeweils aufgetragenen Gesamtaktivität gesetzt. So konnte festgestellt werden, welcher Hormonanteil auf den einzelnen Säulen mit verschiedenen Mengen Austauscher aus dem Serum extrahiert bzw. nicht festgehalten werden konnte. Unter diesen Versuchsbedingungen waren mindestens 5 ml Austauscherbett erforderlich, um die SD-Hormone aus 2,5 ml Serum sicher quantitativ extrahieren zu können.

5.1.2.3. Elution

5.1.2.3.1. Vorwaschen mit Wasser

Wurde nun diese mit markierten Schilddrüsenhormonen beladene 5 ml-Austauschersäule mit ausreichend Aqua bidest. zur Entfernung der überschüssigen HCl reingewaschen und dann an ein Vorratsgefäss mit 0,05 N Kaliumphosphatpuffer pH 11,9 (2.4.) angeschlossen, so dauerte es sehr lange, bis die Schilddrüsenhormone wieder eluiert wurden. Dieser Nachteil erklärt sich aus dem Missverhältnis zwischen der hohen Kapazität des verwendeten Austauschers (1,2 meq/ml; gequollenes Harz) zu der dagegen niedrigen Ionenstärke des 0,05 N Kaliumphosphatpuffers pH 11,9, mit dem das Harz umgepuffert werden musste. Das Elutionsvolumen, in dem sich die extrahier-

ten Schilddrüsenhormone befanden, war damit zu gross, um eine ausreichende Abtrennung des T_3 vom T_4 auf der nachfolgenden Trennsäule (2.3. und 5.2.) erreichen zu können.

5.1.2.3.2. Vorwaschen mit Kaliumchloridlösung

Nun kann man aber die überschüssigen, noch am Austauscher befindlichen H^+ -Ionen vor der Elution der SD-Hormone mit dem KPP mit einer neutralen, hochmolaren K^+ -Salzlösung sehr schnell entfernen, die SD-Hormone bleiben dabei noch am Austauscher. Wir spülten daher mit einer 1 molaren KCl-Lösung, bis alle H^+ -Ionen vom Austauscher verdrängt waren (pH-Umschlag nach neutral), und eluierten dann mit unserem 0,05 N Kaliumphosphatpuffer pH11,9. Im Vergleich zu einer Vorspülung mit Aqua bidest. (3.1.2.3.1.) zeigte sich, dass die Elution der Schilddrüsenhormone nun 1. innerhalb viel kürzerer Zeit und 2. in einem erheblich geringeren, aber immer noch nicht ausreichend kleinem Volumen durchgeführt werden konnte. Während des Vorspülens mit der KCl-Lösung ging kein Hormon verloren.

5.1.3. Ausschüttelverfahren

Mit dem Ziel, diese Serumabtrennung der SD-Hormone noch weiter zu vereinfachen und zu beschleunigen, versuchten wir, als Alternative zu dem beschriebenen Verfahren mit kontinuierlicher Chromatographie (3.1.2.), einfach die Hormone aus dem Inkubationsgemisch durch Ausschütteln mit Austauscher abzulösen. Dazu unternahmen wir folgende Vorversuche:

5.1.3.1. Benötigte Menge Austauscher

Von einer 1:1 (V:V)-Suspension des Austauschers AG 50 W-X 4 minus 400 mesh in 0,1 N HCl (siehe 2.2.1.) wurden unter kontinuierlichem Rühren steigende Mengen entnommen und in 10 ml-Reagensgläser pipettiert. Nach Zugabe von 2,5 ml T_3 - ^{125}I -Inkubationsgemisch (6.5.3.) wurden die Gläser verschlossen und im Rotor 30 min. bei Zimmertemperatur bewegt. Danach wurde der Inhalt in leere 2 ml-Skülen gegossen, vor deren Auslauf wie in 5.1.2.1. beschrieben, ein Filterplättchen lag. Das durchlaufende Inkubationsgemisch wurde aufgefangen, dazu kamen jeweils noch 5 ml Spüllösung, da die Reagensgläser und die Skülen sorgfältig mit 0,1 N HCl nachgespült werden mussten.

Nach Auszählung sowohl der durchgelaufenen als auch der auf dem Austauscher verbliebenen Aktivitäten ergab sich, wie Abb. 18 zu entnehmen ist, dass mit diesem Verfahren zur Ablösung der SD-Hormone aus 2,5 ml Serum nur 2 ml der Austauschersuspension bzw. 1 ml Austauscher genügen. Die hierbei nichtgebundene Radioaktivität entsprach dem "Damage" des T_3 -Arbeitsstandards (vgl. 6.1.2.). Kurven mit T_4 - ^{125}I verliefen deckungsgleich.

5.1.3.2. Inkubationszeit

Analog zum vorhergehenden Versuchsansatz wurden je 2,5 ml Inkubationsgemisch (6.5.3.) mit 2 ml Austauschersuspension verschieden lang geschüttelt, um die Zeitabhängigkeit dieses Extraktionsverfahrens festzustellen. Abb. 19 zeigt, dass eine Schüttelzeit von 20 min. auf dem Rotor bei Zimmertemperatur (ca. 20°C) eine quantitative Ablösung gewährleistete.

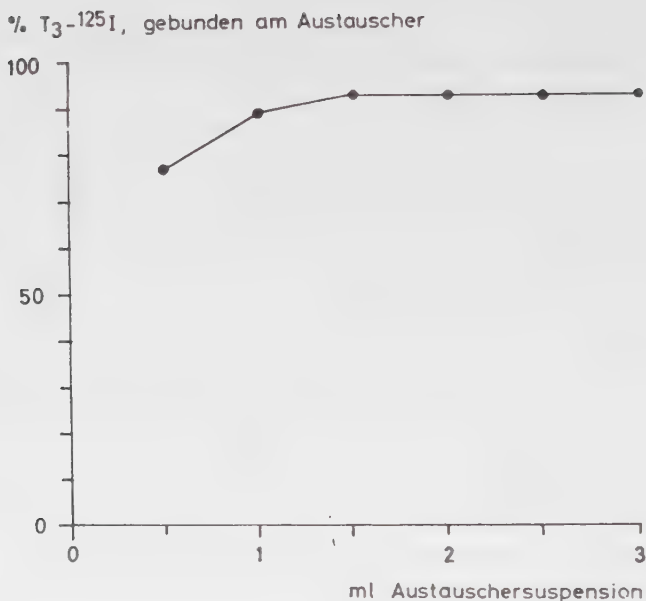


Abb.18: Extraktion der Schilddrüsenhormone aus dem Serum in Abhängigkeit von der verwendeten Menge Austauschersuspension

Ein T_3 - ^{125}I -Tracer (Gesamtaktivität = 100%) wurde aus 2,5 ml Serum mit steigenden Mengen der 1:1-Suspension von AG 50 W-X4 in 0,1 N HCl extrahiert. 2 ml Austauschersuspension genügten für eine quantitative Extraktion. Die ca. 6% dabei nicht-gebundene Radioaktivität entspricht dem "Damage"-Anteil des Tracers. Weiteres siehe 5.1.3.1.

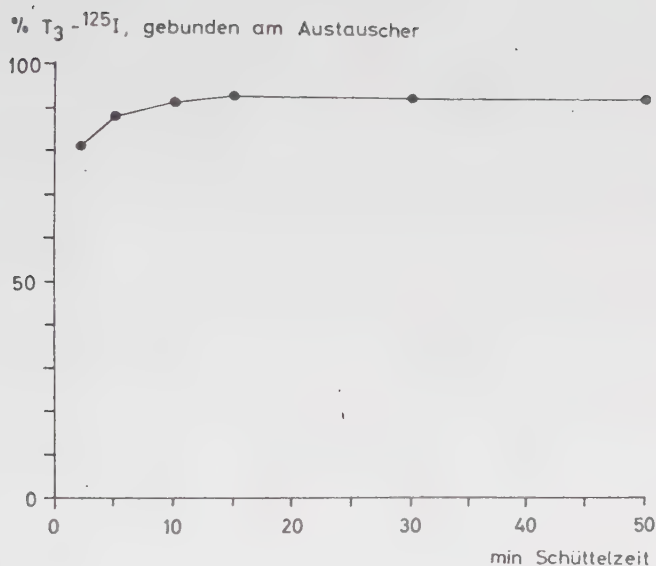


Abb. 19: Extraktion der Schilddrüsenhormone aus dem Serum in Abhängigkeit von der Schüttelzeit

Ein T_3 - ^{125}I -Tracer (Gesamtaktivität 100 %) wurde aus 2,5 ml Serum mit 2 ml der 1:1-Suspension von AG 50 W-X4 in 0,1 N HCl extrahiert. 20 Minuten Schüttelzeit auf dem Rotor bei Zimmertemperatur genügen für eine quantitative Extraktion. Die ca. 7 % dabei nichtgebundene Radioaktivität entsprach dem "Damage"-Anteil des Tracers. Weiteres siehe 5.1.3.1. und 5.1.3.2.

5.1.3.3. Verbindung der Extraktion mit dem nachfolgenden Trennschritt

Die oben beschriebenen Säulchen mit dem ausgefilterten Austauscher (5.1.3.1. und 5.1.3.2.) konnten nun wie die grossen Chromatographiesäulen in 5.1.2. mit 1 M KCl vorgespült und danach mit dem 0,05 N Kaliumphosphatpuffer pH 11,9 eluiert werden. Das Elutionsvolumen der jetzt mit nur 1 ml Austauscher aus 2,5 ml Serum extrahierten Schilddrüsenhormone war nun klein genug (2.2.3.), um gleich auf die Trennsäule aufgetragen werden zu können. Eine weitere Verbesserung dieses Extraktionsschrittes im Sinne einer technischen Vereinfachung und guter Standardisierbarkeit konnte mit der schliesslich verwendeten verschliessbaren "Doppelschliffsäule" mit eingeschmolzener Fritte erreicht werden (2.2.), die durch Aufstecken auf die Trennsäule das Arbeiten in einem geschlossenen chromatographischen System erlaubte (2.3.2.).

5.2. T₃-T₄-TRENNUNG AUF SEPHADEX G-25 SUPERFINE

5.2.1. Theorie und Entwicklung der Methode

Es ist bekannt, dass die JAS wie auch andere aromatische Verbindungen an Dextrangel mehr oder weniger stark adsorbiert werden und keineswegs nur nach ihrer Molekülgrösse aufgetrennt werden können (41, 16). Von dieser Beobachtung ausgehend wurde von HALLMUEBER (25, 34) ein Verfahren zur Auftrennung der JAS erarbeitet, das gerade diese Eigenschaften des Dextrangels ausnützte.

Trägt man auf eine Sephadex G25 s.f.-Säule, die mit Natriumphosphatpuffer pH 7.4 gequellt und äquilibriert ist, eine kleine Probe T₃ und T₄ auf und versucht, die Hormone mit dem gleichen Puffer zu eluieren, stellt man fest, dass sie - offensichtlich wegen der hydrophoben Ringstruktur - sehr stark von Dextrangel festgehalten werden. Erhöht man aber nun den pH-Wert des Elutionsmittels und damit den Ionisationsgrad der phenolischen Hydroxylgruppen (pK für T₃ : 8.45, für T₄ : 6.73 nach EDELHOCH (18)), lässt diese starke Bindung nach, die Hormone können eluiert werden. Bei einem pH-Wert über 11 wird T₃ vor T₄ eluiert und nicht erst umgekehrt, wie es die o.a. pK-Werte erwarten liessen. Offensichtlich wird das Verhalten der Schilddrüsenhormone zu Dextrangel nach pK (siehe oben) und MG (Abb.1) von nichtionogenen Kräften wie den VAN DER WAAL'schen Kräften überlagert.

5.2.2. Säulenpräparation

Verwendet wurden Glassäulen mit eingeschmolzenen Frittenscheibchen aus Glas mit der Porosität G₂, die sich entgegen der in den Broschüren der Fa. Pharmacia Uppsala geäußerten Bedenken bei den von uns verwendeten Gelmenngen und Filtrationsdrücken gut bewährten. Zur Benetzung des Säulenbodens wurde erst eine kleine Menge Aqua bidest. eingefüllt, der Auslauf dann verschlossen, und einen Finger breit weiter Wasser zugegeben. Die Säule wurde nun mit Gelsuspension bis oben gefüllt. Das Gel war zuvor trocken abgewogen und über mindestens 4 Std. in einem Überschuss Aqua bidest. gequellt worden. Währenddessen wurde mehrfach aufgerührt, der Überstand schliesslich weitgehend dekantiert, erneut aufgeschüttelt und die Säule dann gefüllt. Hatte sich eine 3 bis 5 cm hohe Schicht abgesetzt, wurde die Ausflussskapillare geöffnet. Nach Sedimentation des Gels wurde der Überstand bis auf etwa 2 cm abgesaugt, die Grenzschicht aufgerührt und die restliche Gelsuspension aufgegossen. Nach Absetzen des ganzen Gels wurde der Überstand fast vollständig entfernt.

Die fertig gepackten Säulen wurden nun über durchbohrte Gummistopfen oder Schliffaufsätze an die Peristaltikpumpe angeschlossen und mit Puffer gespült, bis sich das Gelbett stabilisiert hatte (etwa drei Gelbett-Volumina). Wegen des geringen Durchmessers der Säulen war eine mechanische Stabilisierung der Gelbettoberfläche mit Filterpapier oder porösen Polyäthylenscheiben nicht nötig. Da die Dexträngelsäulen schliesslich vor und nach jeder Bestimmung jeweils mindestens eine Stunde mit Puffer gespült und die übrige Zeit peinlich sauber und verschlossen gehalten wurden, konnten sie ausnahmslos zwei Wochen verwendet werden, ohne

dass die Qualität etwa durch bakterielle Besiedlung oder Verunreinigungen nachliess. Dabei wurden keine bakterioziden Zusätze verwendet. Bei dem geringen Pumpdruck, unter dem die Säulen betrieben wurden, veränderte sich das Gelbettvolumen nur unwesentlich; ein Aufrühren des Gels erwies sich als überflüssig, ja sogar als nachteilig, da danach eine gleichmässige Packung nicht in jedem Fall wieder erreicht werden konnte.

5.2.3. Auftragen der Proben

5.2.3.1. Auftragen der Proben von Hand

Für einige Vorversuche wurden Standards von JAS oder anderen Substanzen, deren Verhalten bei der chromatographischen Trennung interessierten, direkt auf die Dextrangelsäulen aufgetragen. Dazu wurde der über dem Gel stehende Puffer abgesaugt und die jeweilige Probe vorsichtig mit einer Pipette aufgetragen, ohne dass die Geloberfläche aufgewirbelt wurde. Nach Einsinken der Probe (Auslauf geöffnet) wurde zweimal mit je 1 ml Puffer vorsichtig nachgewaschen und dabei auch die Säulenwand über dem Gelbett abgespült. Sofort nach Einsinken des zweiten ml Puffer wurde der Auslauf der Säule verschlossen. Diese konnte nun luftdicht an die Pumpe angeschlossen werden.

5.2.3.2. Ansaugen der Proben über die Pumpe

Einfacher war es, wenn man die Proben von der Schlauchpumpe ansaugen und kontinuierlich auf die Gelbettoberfläche auftropfen liess. Dabei konnte man die Pumpe entweder ein bestimmtes Volumen oder - etwas ungenauer - eine

bestimmte Zeit lang fördern lassen, woraus sich über die Förderleistung der Pumpe wiederum das angesaugte Volumen errechnete. Vorteilhaft war diese Methode insbesondere, wenn wir die Verbindung von Säule I und II simulieren wollten, und statt des Eluates von Säule I ca. 7 ml einer Verdünnung von 0,5 ml Arbeitsstandard mit dem Kaliumphosphatpuffer ansaugten.

5.2.3.3. Auftragen der Proben von der Extraktionssäule

Zur Steckverbindung zwischen der Extraktionssäule und der Trennsäule vgl. 2.3.2.

5.2.4. Voraussetzungen für eine ausreichende T_3 - T_4 -Trennung

5.2.4.1. Säulendimension

Da die Trennwirksamkeit mit der Gelbetthöhe steigt, andererseits aber die Durchflussgeschwindigkeit etwa umgekehrt proportional dazu abfällt (20), unternahmen wir vergleichende Versuche mit verschiedenen dimensionierten Säulen. Geeignet zeigte sich bei der schliesslich verwendeten Menge von 4 g Sephadex G-25 superfine eine Säule mit Glasfritte (5.2.2.) und 13 mm Innendurchmesser. Das gequollene Gel stand darin etwa 135 mm hoch. Die gewählte Säulenhöhe erlaubte es, bei verhältnismässig niedrigen Pumpdrücken zu arbeiten, da der passive Abfluss nur wenig unter den von der Pumpe geförderten Volumina lag. Abdichtung und druckabhängige Veränderungen der Gelbetthöhe oder des Überstandes warfen so keine Probleme auf.

5.2.4.2. Gelmenge

Mit einer Erhöhung der Gelmenge steigt linear das freie Intervall zwischen den getrennten Hormonpeaks (Abb.4), die Peaks selbst werden aber auch breiter und flacher, die Elutionsvolumina grösser und die Elutionszeit länger. Obwohl sich die Schilddrüsenhormone, z.B. von Hand aufgetragen (5.2.3.), auf sehr kleinen Sephadex-Säulen auftrennen lassen, verwendeten wir bei dem immer noch verhältnismässig grossen Auftragsvolumen von der Extraktionssäule (2.2.3.) 4 g Sephadex G-25 superfine (Trockengewicht). Damit war das freie Intervall zwischen T_3 und T_4 weit genug (Abb.4), um bei 25 gleichzeitig betriebenen Säulen und den sich vor allem aus den verhältnismässig grossen Toleranzbereichen der Pumpenschläuche ($\pm 10\%$ Nennförderleistung) ergebenden Differenzen die eluierten Hormone zeitkonstant und mit genügender Sicherheit getrennt aufzufangen.

5.2.4.3. Temperatur

Die Adsorptions-/Desorptionsvorgänge bei der Chromatographie sind naturgemäss sehr temperaturabhängig (20,16), ihre Geschwindigkeit erhöht sich wie bei den meisten chemischen Reaktionen unter sonst gleichen Bedingungen bei einer Temperaturerhöhung um 10°C etwa um den Faktor 2. Wir temperierten die Sephadexsäulen, die schliesslich in ein geschlossenes Wasserbad montiert wurden, mit einem Umwälzthermostaten auf konstant 27°C . Bei dieser Temperatur konnte die Chromatographie einerseits schnell genug durchgeführt werden, andererseits lag die Temperatur nicht so hoch, dass man das Elutionsmittel hätte vorwärmen müssen, um das Auftreten von Gasbläschen im Gelbett zu unterbinden.

5.2.4.4. Puffer

Eine gute Abtrennung des T_3 vom T_4 auf Sephadex G-25 superfine konnte mit verschiedenen Puffern bei pH-Werten über 11 erzielt werden. Die höchste Trennschärfe und relativ schmale Elutionspeaks erhielten wir bei pH 11,9 des 0,05 N Kaliumphosphatpuffers (Abb.4). Ein Zusatz von organischen Lösungsmittelkomponenten, die durch ihre Eigenadsorption die Hormone von der Dextran-Matrix verdrängen helfen könnten, brachte praktisch keine Verbesserung, weshalb darauf auch wegen der Gefahr der Entstehung von Artefakten (z.B. Ester-Bildung; siehe 7.1.) verzichtet wurde.

5.2.4.5. Pumpgeschwindigkeit

Wir eluierten mit einer Geschwindigkeit von 0,42 ml/min, die durch die Wahl der Schläuche für die Peristalticpumpe festgelegt wurde. Als Toleranzgrenzen waren bei den verwendeten Schläuchen mit 0,035" Innendurchmesser 0,37 ml/min und 0,47 ml/min angegeben, das entspricht einer garantierten Höchstabweichung um ca. $\pm 10\%$ von 0,42 ml/min Nennförderleistung. Im Experiment waren aber die in der Zeiteinheit geförderten Volumina bei geringeren Abweichungen sehr gut reproduzierbar, wenn man die Schläuche nach Vorschrift pflegte und ihren Andruck an die Walzen sorgfältig einregulierte. Mit der gewählten Pumpleistung liess sich die Chromatographie unter geringem Druck und trotzdem in verhältnismässig kurzer Zeit durchführen.

5.2.5. Fraktionensammeln und Auswertung

Zur Darstellung der Elutionskurven radioaktiv markierter Jodaminosäuren bei Vorversuchen oder zur Kontrolle einer ausreichenden T_3 - T_4 -Trennung wurde das Eluat von der Trennsäule mit einem automatischen Fraktionssammler (LINEAR II, Serva Heidelberg) in kleinen zeit- oder volumenkonstanten Fraktionen gesammelt. Im allgemeinen wählten wir Zeitintervalle von 5 min vor, entsprechend 2,1 ml-Portionen, da wir bei der Gesamtbestimmung die Hormone nach ihrer Auftrennung zur weiteren Konzentration zeitkonstant auffangen wollten (vgl. Abb.4 und Abb.2, e).

Diese Proben sowie die zur Feststellung der aufgetragenen Gesamtaktivitäten aufgehobenen konnten nun am Gamma-messplatz (gamma guard 150 Fa. Tracerlab) ausgezählt werden. Die Messzeit wurde so eingestellt, dass der statistische Fehler der Impulszählung $f = \frac{100}{n} \%$ n = Anzahl der Impulse

möglichst klein gehalten werden konnte. Der Nulleffekt wurde laufend überprüft, lag aber praktisch immer bei 50 IPM, zumal stets frische Einmal-Reagenzgläser verwendet wurden. Nach Abzug des Nulleffektes konnten die einzelnen Impulsraten in ein Diagramm gegen das Elutionsvolumen eingetragen, und die prozentualen Anteile der Aktivitätsgipfel an der Gesamtaktivität errechnet werden.

Analog wurde bei Vorversuchen zur Extraktion und Konzentration der Schilddrüsenhormone verfahren (z.B. Abb.3 und Abb. 5).

5.3. KONZENTRIERUNG DER ELUATE DER TRENNSAULE

5.3.1. Vorüberlegungen

Vor der Bestimmung der Schilddrüsenhormone war es notwendig, die nunmehr getrennten Eluate, die T_3 (ca. 45 ml) oder T_4 (ca. 60 ml) enthielten, auf ein kleines Volumen einer definierten Lösung zu reduzieren.

Dabei galt es, folgende Punkte zu berücksichtigen:

- 1.) Die Empfindlichkeit der Mikrojodbestimmung (vgl. 2.5.3.2.) erforderte eine Konzentrierung des in ca. 45 ml von der Trennsäule eluierten T_3 (2.3.3.) auf etwa 1 ml, damit der T_3 -Jodgehalt von maximal 2,5 ml Serum im Messbereich der Mikrojodbestimmung lag. T_4 hätte aufgrund der wesentlich höheren Serumkonzentration nicht so hoch konzentriert werden müssen, es sollte aber zum Vergleich ebenso wie das T_3 bestimmt werden.
- 2.) Um die SD-Hormone mit kupferaktiviertem Zinkstaub dejodieren zu können (vgl. 5.4.), mussten diese nach der Einengung in einer starken Lauge, möglichst in 1 N NaOH vorliegen. Darin nämlich hatten wir, wie unten beschrieben, die zuverlässigste Dejodierung durchführen können.
- 3.) Eine Eindampfung oder gar Lyophilisierung kam bei den grossen Volumina nicht in Betracht, zudem mussten die Hormone zuvor von den Salzen der Pufferlösung befreit werden.

- 4.) Eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (z.B. Butanol) kam nicht in Frage, denn Vorversuche hatten neben technischen Schwierigkeiten gezeigt, dass bei dem notwendigerweise folgenden Eindampfen mit nicht ausreichend standardisierbaren Hormonverlusten gerechnet werden musste.

Unter diesen Bedingungen bot sich folgendes Vorgehen an:

- 1.) Extraktion der getrennten Hormone aus den Eluaten von den Trennsäulen auf Ionenaustauscher- oder Dextrangelsäulen (vgl. 5.1.1.).
- 2.) Elution der Hormone von diesen Säulen in einem kleinen Volumen eines flüchtigen Mediums und Eindampfung zur Trockne, dann Wiederaufnahme des Rückstandes in einer sowohl nach Volumen als auch Konzentration exakt definierten Lösung (1 N NaOH).

Eine Elution gleich mit der für die Mikrojodbestimmung erforderlichen 1 N NaOH von den Kationenaustauscher- oder Dextrangelsäulen konnte eben diese Bedingungen einer solchen exakt definierten Elution nicht erfüllen.

5.3.2. Volumenreduzierung durch Säulenchromatographie

5.3.2.1. Säulenpräparation

Wie bei den Vorversuchen in 5.1.2.1. verwendeten wir als Chromatographiesäulen bei Austauschern Einmalspritzen mit einigen Lagen Glasfasermatte vor dem Auslauf. Dextrangelsäulchen mussten allerdings mit feineren Filterpapierplättchen (Glasfaser-Vorfilter Typ SM 13400, Sartorius Membranfilter) abgeschlossen werden. Nach Anfeuchten der Filterplättchen (Aqua bidest.) wurde das Harz oder Gel als Suspension im jeweiligen Lösungsmittel eingefüllt; die Gelbetthöhe konnte an der Graduierung der Spritzen abgelesen werden. Das Quellen, Vorreinigen und evtl. Umpuffern der Gele und Harze geschah nach Vorschrift, weitere Angaben mögen dem Folgenden zu entnehmen sein. Konzentratorsäulchen mit Austauschern wurden einfach unter den Auslauf der Trennsäulen bzw. der T-Verbindungsstücke zum Ansäuern (2.4.1.2.) gestellt, Sephadex-Säulen mussten dagegen luftdicht über Silikongummistopfen angeschlossen werden, da sie nicht schnell genug passiv abliefen.

5.3.2.2. Ansäuern der Eluate von der Trennsäule zur Anreicherung des T_3 bzw. T_4 auf Kationenaustauschern oder Dextrangel

Wie schon bei der Extraktion der Schilddrüsenhormone aus dem Serum angeführt, können diese sowohl im alkalischen Milieu an Anionenaustauschern als auch im Säuren an Kationenaustauschern gebunden werden (5.1.1.). Im neutralen oder sauren Bereich werden sie verhältnismässig fest auch an Dextrangel gebunden (5.2.1.). Die alkalischen Eluate

von der Trennsäule konnte man also direkt über kleine Anionenaustauschersäulchen schicken. Bei Verwendung von kleinen Kationenaustauschersäulchen (damit geringe H^+ -Kapazität) und Dextrangelsäulen mussten dagegen die Eluate zuvor angesäuert werden. Dazu hätte man diese z.B. in einem Messgefäß auffangen, ansäuern und dann erst wieder über die Konzentrationsäulen schicken können. Eine kontinuierliche Ansäuerung aber mit Hilfe einer zweiten Schlauchpumpe (2.4.1.2.) erlaubte uns, auch weiterhin in einem geschlossenen, kontinuierlichen Chromatographiesystem zu arbeiten. Zum Ansäuern eignete sich aus technischen Gründen sehr gut verdünnte Salzsäure.

5.3.2.3. Anionenaustauscher

Da die Hormone nach ihrer Auftrennung in dem alkalischen 0,05 N Kaliumphosphatpuffer (pH 11,9) vorlagen, bot sich eine Extraktion des T_3 bzw. T_4 direkt auf Anionenaustauschersäulen an (5.1.1.).

Auf 1 ml-Säulchen mit den basischen Anionenaustauschern IRA-93, IRA-401, Dowex 1x8, 2x8, etc. wurde das T_3 bzw. T_4 aus den Eluaten (45 bzw. 60 ml) quantitativ festgehalten. Die Säulchen mussten lediglich zu den entsprechenden Zeiten (5.4.1.3., Abb.4) unter den Auslauf der Trennsäulen gestellt werden.

Es zeigte sich jedoch, dass die aufgefangenen Hormone nur wieder mit hochkonzentrierten organischen Säuren (z.B. 50 % Ameisensäure) in einem hinreichend kleinen Volumen eluiert werden konnten. Weil aber das T_3 bzw. T_4 beim Ein-

dampfen dieser flüchtigen Säuren nicht quantitativ und vor allem nicht reproduzierbar im Rückstand blieb (Verluste durch HI-Bildung?), schieden Anionenaustauscher für eine nachfolgende chemische Bestimmung aus.

Solche Anionenaustauschersäulen, z.B. mit 1 ml IRA 93 boten sich jedoch an, wenn nur radioaktiv markiertes T_3 bzw. T_4 konzentriert wurde, das dann ohne Elution direkt auf der Säule (unter Beachtung der Zählgeometrie) am Gamma-Messplatz bestimmt werden konnte (25).

5.3.2.4. Kationenaustauscher

Bei Ansäuerung des Eluats von der Trennsäule (2.4.1.2. und 5.3.2.2.) konnte jeweils das T_3 aus ca. 45 ml bzw. das T_4 aus 60 ml quantitativ auf 1 ml-Kationenaustauschersäulchen mit folgenden Harzen (in H^+ -Form) extrahiert werden:

AG 50 W-X 4 (100-200 und minus 400 mesh)

IRC-50

IR-112

Bio-Rex 70 (50-100 mesh).

Nach Spülen dieser Säulchen mit 1 N HCl und Aqua bidest. (2.4.1.4.), wobei T_3 bzw. T_4 fest an den Austauschern gebunden blieb, konnten die Hormone mit 5 N NH_3 schliesslich wieder in einem sehr scharfen Peak eluiert werden. Die besten Resultate wurden mit dem schwach sauren Bio-Rex 70 mit 95 % Ausbeute in 4,5 ml Ammoniakeluat erzielt (Abb.5). Eine Vorspülung der Säulchen mit verschiedenen Ammoniumsalzen (analog zu 5.1.2.3.2.) brachte keine weiteren Verbesserungen.

5.3.2.5. Dextrangel

5.3.2.5.1. Sephadex G-25

Bei kontinuierlicher Ansäuerung des Eluats von der Trennsäule (5.3.2.2.) konnte das T_3 nur auf einer nachgeschalteten relativ grossen Säule mit 7,5 ml Sephadex G-25 superfine oder fine (ca. 3 g Trockensubstanz) während der Elution und des nachfolgenden Waschschrilles sicher quantitativ retiniert werden. Nach diesem Zwischenspülschritt mit Aqua bidest. war der Elutionspeak des T_3 von einer so grossen Konzentratorsäule selbst mit der hochkonzentrierten N-Ammoniaklösung mit einem Volumen von über 8 ml sehr gross. Zusätzlich waren die Säulchen dann für weitere Versuche unbrauchbar.

5.3.2.5.2. Sephadex G-15

Der stärker vernetzte nächste Dextrangeltyp Sephadex G-15 wurde ebenfalls auf seine Verwendbarkeit für den Konzentrationsschritt geprüft. Dieses Gel adsorbiert die Schilddrüsenhormone wesentlich stärker als G-25, es waren entsprechend nur ca. 1,5 ml Gelbett notwendig, um T_3 oder T_4 aus den angesäuerten Eluaten (5.3.2.2.) zu isolieren. Die Wiederfinderaten bei der Elution mit 5 N NH_3 lagen dann aber nur bei 75 % und erwiesen sich zudem als schlecht standardisierbar. Auch ein Zusatz von Methanol und Äthanol konnte die Ausbeuten nicht verbessern.

5.3.2.5.3. Sephadex LH-20

Auf 1,5 ml-Säulchen mit Sephadex LH-20 konnten T_3 oder T_4 bei kontinuierlicher Ansäuerung (5.3.2.2.) vollständig zurückgehalten werden und nach einem Waschschriff mit Aqua bidest. in weniger als 4 ml einer Mischung gleicher Volumina von 15 N Ammoniaklösung und 50 Vol% Methanol sehr standardisiert nahezu 100 %ig eluiert werden. Bei der Verbindung dieses Konzentrierschrittes mit der chemischen Jodbestimmung ergab sich jedoch die Schwierigkeit, den organischen Lösungsmittelanteil im vorher notwendigen Abdampfschritt im geschlossenen System (5.3.3.) zu entfernen. Deshalb wurde schliesslich für den Konzentrierschritt der leicht handzuhabende Kationenaustauscher Bio-Rex 70 verwendet.

5.3.3. Eindampfen der Eluate von der Konzentriersäule

Vor der nachfolgenden Mikrojodbestimmung musste das Lösungsmittel, mit dem das T_3 bzw. T_4 von den Konzentriersäulen eluiert wurde, vollständig abgedampft werden (5.3.1.).

Nur durch Anlegen eines Vakuums war dieser Vorgang mit mehreren Stunden sehr zeitaufwendig, zudem Siedeverzüge vermieden werden mussten.

Bei Erhitzen der Probengläser im Wasserbad und Überleiten von Luft mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurden in den Proben immer Verunreinigungen mit angereichert, die in der chemischen Jodbestimmung erheblich störten und auch nicht bei Durchleitung der angesaugten Luft sowohl durch Natronlauge als auch durch konzentrierte Schwefelsäure usw. in vorgeschalteten Waschflaschen beseitigt werden konnten.

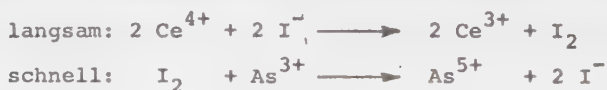
Diese Störfaktoren traten beim Eindampfen unter nachgereinigtem Stickstoff nicht mehr auf. Um den Verbrauch auf ein vertretbares Mass zu reduzieren, wurde schliesslich eine Apparatur zur Einengung im geschlossenen System unter rezirkulierendem Stickstoff aufgebaut (2.4.2.; Abb.6). Die Pumpe hatte eine Höchstleistung von 1000l/h, die wir allerdings nicht voll ausnutzten. Bei diesen Volumina, die in der Zeiteinheit über die Proben geblasen wurden (je etwa 0,75 l/min), konnten wir das Wasserbad auf 75°C bis 80°C temperieren, ohne Siedeverzüge befürchten zu müssen. Das Vorwärmen des Stickstoffs verhütete ausserdem ein Beschlagen im Inneren der Gläser und an den Stopfen. Dadurch und durch die besondere Konstruktion der "Spinne" konnte das Zurücktropfen von Kondensat mit Sicherheit vermieden werden.

5.4. NACHWEIS DER SCHILDDRÜSENHORMONE ANHAND IHRES JODGEHALTES

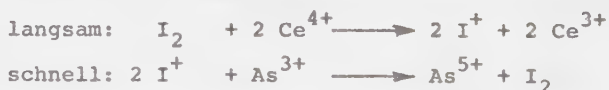
5.4.1. Chemische Jodbestimmung

5.4.1.1. Theorie

SANDELL und KOLTHOFF (60) berichteten erstmals 1937 über den katalytischen Effekt von anorganischem Jodid auf die Redoxreaktion zwischen 4-wertigem Cer und 3-wertigen Arsen in verdünnter Schwefelsäure, wodurch es möglich wurde, auch geringe Mengen an anorganischem Jod nachzuweisen, die durch eine Titration nicht mehr zugänglich waren. Heute wird im allgemeinen dem Jodid eine pseudokatalytische Funktion zugeschrieben, wie sie zuerst von DUBRAVCIC (17) formuliert wurde:



DEMAN (57) postulierte eine Reaktion über ein Jodonium-Ion, als Gleichung dargestellt:



I^{+} liegt dabei wahrscheinlich als $(\text{H}_2\text{OI})^{+}$ vor (5). Dem Reaktionsgemisch müssen zur Stabilisierung Chlorid-Ionen zugesetzt werden, sonst würden die Ce^{4+} -Ionen evtl. das Jodid bis zum Jodat weiteroxidieren, das aber seinerseits die Cer-Arsenit-Reaktion nur schwach katalysiert (17). Chloridionen verhindern diese unerwünschte Oxidierung, indem sie mit Jod Verbindungen wie I_2Cl^{-} , HICl_2 und ICl eingehen. Als empfehlenswerte Konzentration der Chlorid-

ionen im Endreaktionsgemisch wurde 0,1 bis 0,3 M angegeben (17).

Bei den meisten Redoxreaktionen sind die Potentiale vom pH-Wert abhängig. Darüber hinaus bestehen spezifische Einflüsse von Fremdionen. Die Cer-Arsenit-Reaktion läuft im schwefelsauren Milieu ab, ein Schwefelsäuregehalt von 2,5 - 3,0 N im Endreaktionsgemisch wurde hier als optimal beschrieben (73). Eine zusätzliche Beschleunigung der Reaktion durch Perchlorsäure stellte HOCH et al. (28) fest, die durch den beträchtlichen Unterschied des Redoxpotentials $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ in Gegenwart verschiedener Säuren erklärbar ist. Das Normalpotential gegen die Normalwasserstoffelektrode gemessen beträgt (71):

in 1 M HCl	1,28 V
in 1 M HClO_4	1,70 V
in 1 M H_2SO_4	1,44 V

Liegen nun die As^{3+} -Ionen im Überschuss gegenüber den Ce^{4+} -Ionen (STOLC hielt ein Verhältnis von 20 : 1 für optimal (72), und beide Substrate in hoher Konzentration gegenüber dem zu messenden Jodid vor, so verläuft die pseudokatalytische Reaktion wie eine Reaktion erster Ordnung, da ja die Reduktion des I_2 durch As^{3+} sehr schnell verläuft, einen Zusatz der stabilisierenden Chloridionen vorausgesetzt. Man kann also formulieren:

$$-d\text{Ce}^{4+}/dt = k(\text{I}^-);$$

Daraus folgt, dass sich die Absorption der sich entfärbenden Ce^{4+} -Lösung zu jeder Zeit logarithmisch proportional zur I^- -Konzentration verhält. Das intensiv gelbe Ce^{4+} bildet in Schwefelsäure wahrscheinlich einen

$\text{H}_2\text{Ce}(\text{SO}_4)_3$ -Komplex und hat ein Absorptionsmaximum bei 370 m μ (61), der Umsatz zum farblosen Ce^{3+} lässt sich also photometrisch gut verfolgen.

5.4.1.2. Entwicklung der Methode

Die Jodbestimmung mit dieser Cer-Arsenit-Reaktion hat bei der Bestimmung des PB^{127}I weite Verbreitung gefunden. Wir bedienten uns dazu einer Modifikation des PBI-Auto-Analyzers der Firma Technikon, Frankfurt a.M. (33). Zur Messung der Serum- T_3 -Spiegel musste diese Methode abgeändert, vor allem deren Empfindlichkeit erheblich gesteigert werden.

Die erwähnte Apparatur zur Bestimmung des PB^{127}I besteht im Wesentlichen aus:

- 1.) "Input Manifold": Eingabeeinheit mit Pumpe I und Probenehmer zum kontinuierlichen Ansaugen der Serumproben und Vermischen mit den Reagentien zur sauren nassen Veraschung.
- 2.) "Digester": Veraschungseinheit; eine beheizte Glashelix, durch die das Reaktionsgemisch von 1.) transportiert wird. Alle organischen Bestandteile werden darin zerstört.
- 3.) "Output Manifold": Bestimmungseinheit mit Pumpe II zur kontinuierlichen Entnahme der veraschten Proben aus 2.) und Vermischung mit den Reagentien zur colorimetrischen Bestimmung der Jodgehalte nach der Cer-Arsenit-Reaktion.

Nun lag das T_3 bzw. T_4 aus dem Serum nach Abtrennung aller organischer Bestandteile, Auftrennung und Konzentration mit der angegebenen Methode bereits als anorganisches Jod

zur Bestimmung vor. Auf die halboffene Digestoreinheit konnte also verzichtet werden, wir schalteten sozusagen den Probennehmer gleich der Nachweiseinheit vor und arbeiteten im geschlossenen System (31).

Ohne nun auf die vielfältigen Vorversuche näher einzugehen, wurde eine Erhöhung der Empfindlichkeit des Jodnachweises in der Mikrojod- gegenüber der FBI-Bestimmung um mehr als das zehnfache vor allem durch eine Modifikation in der Zusammensetzung der einzelnen Analysenlösungen erreicht. Entscheidend war dabei der Zusatz von Perchlorsäure und Salpetersäure zum Säuregemisch in den angegebenen Konzentrationen (6.4.).

Eine deutliche Erhöhung von Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit konnte durch apparative Verbesserungen erzielt werden: Die Schlauchpumpe der Fa. Ismatec und mehrere Pulsdämpfer (2.5.2.2.) gewährten einen besonders ruhigen und gleichmässigen Lauf des Analysengemisches. Bei der starken Temperaturabhängigkeit der Cer-Arsenit-Reaktion sorgte ein Präzisionsthermostat für die Temperaturkonstanz im Heizbad ($\pm 0,01^{\circ}\text{C}$, siehe 2.5.2.3.). Statt eines Colorimeters wie bei der FBI-Bestimmung wurde ein Photometer verwendet, die Messung konnte dadurch näher am Absorptionsmaximum des Ce(IV)-Komplexes durchgeführt werden (2.5.2.4.).

Offensichtlich ist es aus der Zeit der Messung mit Spektralphotometern noch üblich, bei 405 bis 420 nm (wie z.B. im FBI-AutoAnalyzer) zu messen, obwohl das Absorptionsmaximum des Cer(IV)-Komplexes bei ca. 317 nm liegt. Wir konnten auf alle Fälle mit dem verwendeten Filter für 366 nm die Steilheit der Eichkurve gegenüber einer

Messung bei 405 nm etwa um den Faktor 1,3 steigern. Eine weitere Verbesserung fanden wir bei 334 nm, die dazu benötigte Photometerausrüstung mit Zusatzverstärker stand uns aber für die Dauer der Experimentalserie nicht zur Verfügung.

Das von uns schrittweise als optimal erarbeitete Verfahren zum Nachweis von Jod in einer Konzentration bis herab zu 0,5 ng/ml ist in 2.5. beschrieben.

5.4.2. Dejodierung der Schilddrüsenhormone

5.4.2.1. Theorie der katalytischen Dehalogenierung

Organische Jodverbindungen wie z.B. die Schilddrüsenhormone und verwandte JAS üben eine ähnliche Wirkung wie das freie Jod auf die Ce^{4+} -Reduktion aus (1, 10, 47). Die Stärke der pseudokatalytischen Wirkung der einzelnen JAS ist aber nicht nur von der Anzahl der Jodatome, also dem Jodgehalt, sondern auch von der Stellung der Jodatome im jeweiligen Molekül abhängig. Als gesichert kann heute angenommen werden, dass die Reaktion über eine Freisetzung des Jodatoms aus der organischen Bindung läuft, wofür z.B. eine Hydroxylgruppe in Orthostellung zum Jodatom als essentiell angenommen wurde (10). Unser Bestreben war es, die Unterschiede der "katalytischen" Wirksamkeit der einzelnen JAS, bezogen auf ihren Jodgehalt, auszugleichen, um somit alle zu untersuchenden Jodverbindungen auf eine Jodideichkurve beziehen zu können und dadurch gleichzeitig die Steilheit der Eichkurve und hiermit die Empfindlichkeit des Nachweises verbessern zu können (31).

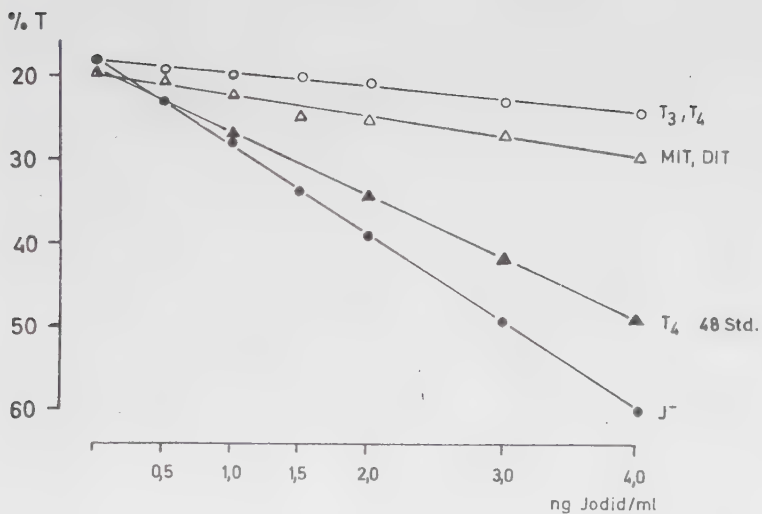


Abb. 20: Jodnachweis in Jodaminosäuren mit der Ce(IV)/As(III)-Reaktion ohne vorherige Dejodierung.

Erklärung siehe 5.4.2.1.

Als Hydrierungskatalysator verwendeten wir kupfer-aktiviertes Zink in stark alkalischem Milieu, um den entstehenden flüchtigen Jodwasserstoff sofort zu binden. Das Zinkpulver muss mit einem anderen Metall - in unserem Fall Kupfer - gewissermassen verunreinigt sein, sonst überziehen sich die Zinkteilchen sehr schnell mit einer "Wasserstoffhaut", die verhindern würde, dass das Zink weiterhin seine beiden s-Elektronen abgeben und in Lösung gehen könnte. Das freigesetzte Jodid konnte dann in der Mikrojodbestimmung nachgewiesen werden.

5.4.2.2. Herstellung des kupferaktivierten Zinkstaubes

Je 0,5 g Zinkstaub (p.a.Merck) wurden mit 12,5 ml 4%iger Kupfer(II)sulfatlösung versetzt, sofort 1 bis 2 min. kräftig geschüttelt und auf einer Nutsche (G3) gründlich mit Aqua bidest. gewaschen (ca. 0,5 l; Wasserstrahlpumpe). Der Zinkstaub, jetzt fast schwarz, bleibt etwas feucht, man kann ihn so einige Stunden zugedeckt aufbewahren. Es empfiehlt sich aber, ihn jedesmal frisch zuzubereiten, in Vorversuchen hatte es sich nämlich gezeigt, dass seine Fähigkeit zu dejodieren oft schon nach 6 Stunden erheblich gesunken war.

5.4.2.3. Praktische Durchführung

Je 1 ml von T_3 - oder T_4 -Lösungen in 1 N NaOH wurde mit einer kleinen Spatelspitze, entsprechend 5 bis 10 mg des kupferaktivierten Zinkstaubes (5.4.2.2.) versetzt und sofort umgeschüttelt. Danach wurden die mit Parafilm^R verschlossenen Probengläser mit der Suspension im Schüttelbad (Fa. Köttermann) bei 37°C mindestens eine Stunde inkubiert. Die angegebene Menge Zinkstaub reicht aus für eine voll-

ständige Dejodierung selbst bei hohen T_4 -Konzentrationen.

Aus den Proben musste danach der Zinkstaub scharf zentrifugiert werden (Eppendorf-Zentrifuge 3200). Dem klaren Überstand wurde mit automatischen Mikroliterpipetten ein Aliquot entnommen und - evtl. mit 1 N NaOH weiterverdünnt (siehe 2.5.3.1.) - in die Probebechergläser zur Mikrojodbestimmung gegeben (siehe 2.5.3.2.).

5.4.2.4. Eichkurven mit T_3 - und T_4 -Standards in 1 N NaOH

Die beschriebene Vorbehandlung mit kupferaktiviertem Zinkstaub gewährleistete eine nahezu vollständige Dejodierung der Jodaminosäuren. Die Eichkurven für T_3 und T_4 waren jetzt praktisch identisch mit der Jodideichkurve (Abb. 21), was auch für die Jodtyrosine MIT und DIT gilt. Die katalytische Wirkung von Kaliumjodid mit T_3 - bzw. T_4 -Lösungen jeweils gleichen Jodgehaltes ergaben bei Vergleich der erhaltenen Extinktionen eine durch den Nullpunkt gehende Gerade mit dem Regressionskoeffizienten $b = 0,96$ (Korrelationskoeffizient $r = 0,999$; 31).

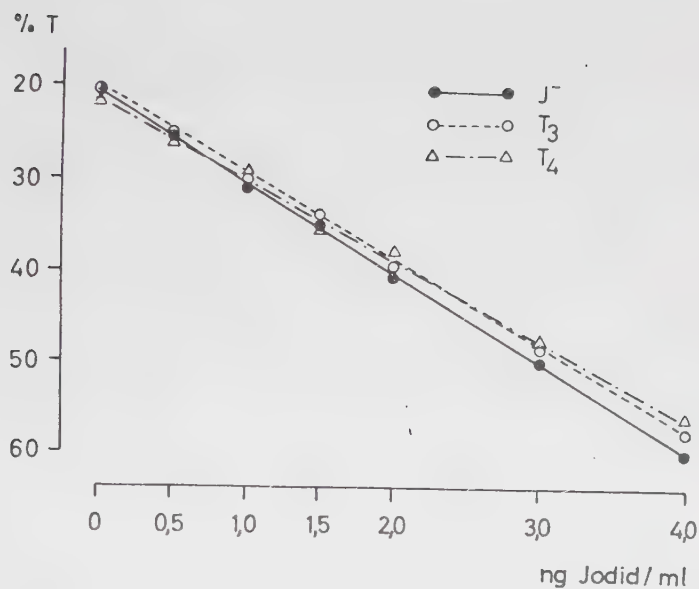


Abb. 21: Jodnachweis in Jodaminosäuren nach Dehalo-
genierung durch kupferaktivierten Zinkstaub.
Erklärung siehe 5.4.2.4.

5.5. SCHRITTWEISE VERBINDUNG DER CHROMATOGRAPHISCHEN AUFTRENNUNG DES T_3 - UND T_4 MIT DEM CHEMISCHEN JODNACHWEIS

Nach der chromatographischen Trennung auf Sephadex G-25 wurden wie oben beschrieben T_3 - bzw. T_4 -Eichstandards von den Konzentriersäulchen mit 5 N NH_3 eluiert (2.4.1.5.). Nach vollständigem Abdampfen dieses Lösungsmittels im geschlossenen System (2.4.2.) wurden die Rückstände in 1 ml 1 N NaOH wieder aufgenommen und nach reduktiver Dehalogenierung (5.4.2.3.) mikrochemisch bestimmt. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die so gewonnenen Messwerte der T_3 - bzw. T_4 -Eichstandards deutlich über der KI-Standarddeichkurve lagen. Zur Abklärung dieser falsch erhöhten Messwerte nach Chromatographie wurden die Einzelschritte zwischen Mikrojodbestimmung und Konzentrierschritt überprüft:

5.5.1. Eindampfschritt

Es wurden wiederholt je 4,5 ml der 5 N NH_3 -Lösung zur Trockne eingedampft, die zur Elution der Schilddrüsenhormone von der Konzentriersäule verwendet werden sollte. Nach Zugabe von je 1 ml 1 N NaOH in die Einenggefäße und Nachweis in der Mikrojodbestimmung erwies sich unsere Methode zur Einengung als "sauber", es wurden jeweils Nullwerte gemessen.

Schwierigkeiten bekamen wir allerdings, als wir NH_3 -Lösung "suprapur" verwendeten, die in Kunststoffgefäßen (!) geliefert war: Sie lieferte in der Mikrojodbestimmung stark überhöhte Werte. Eine entsprechende unterschiedliche Verfälschung der Messwerte in der chemischen Jodbestimmung

konnte bei Verwendung von in Kunststoffflaschen gelieferter NaOH p.a. beobachtet werden. Möglicherweise waren im alkalischen Milieu Chloridverbindungen oder Weichmacher in Lösung gegangen (PVC!).

5.5.2. Eindampfschritt mit Dejodierung

Es wurden auf ihren Jodgehalt bezogene Verdünnungsreihen beider Schilddrüsenhormone von 0 bis 10 ng I^- (bei T_4 auch höhere Werte bis 100 ng I^-) pro 5 ml 5 N NH_3 angesetzt und zur Trockne eingeeengt. Um nun die für die Dejodierung notwendige Zeit abkürzen zu können, fügten wir bereits den Ammoniakeluaten je 5 mg kupferaktivierten Zinkstaub (5.4.2.2.) zu, sodass bereits eine Dejodierung von T_3 bzw. T_4 während des Einengens bei ca. 75°C erfolgen konnte, die jedoch nicht in jedem Fall vollständig war, da das Abdampfen nur wenig länger als 10 min. dauerte. Auf alle Fälle war aber das Jod nach zweifacher Dejodierung vollständig in die anorganische Form gebracht; die Inkubationszeit nach der zweiten Zugabe von Zinkstaub konnte dadurch auf eine halbe Stunde gesenkt werden. Nach dieser Dejodierung und Auszentrifugieren des Zinkstaubes wurden die Proben in der Mikrojodbestimmung gemessen. Mit diesen "simulierten"Eluaten von der Konzentratorsäule erhielten wir Eichkurven für T_3 - und T_4 -Standards, die sich wie solche für T_3 und T_4 in NaOH nach Dejodierung mit der KI-Eichkurve nahezu deckten (5.4.2.4.).

5.5.3. Bestimmung der Eluate von der Konzentriersäule

Genauso wie im letzten Abschnitt beschrieben, wurden schliesslich die NH_3 -Eluate von den Konzentriersäulen (2.4.1.5.) behandelt. Zuerst wurden nur Leerwerte von den Kationenaustauschersäulchen gemessen, also nur NH_3 -Eluat ohne Schilddrüsenhormon. Dabei mussten wir feststellen, dass hierbei ein Blindwert gemessen wurde, der etwa 1 ng I^- in der Mikrojodbestimmung vortäuschte. Dieser Wert war also auf den Konzentrationsschritt mit den Kationenaustauschersäulchen zurückzuführen. Die Verunreinigung entstand offensichtlich aus der Reaktion zwischen den Austauscherguppen und der Ammoniaklösung. Sie war nämlich vorwiegend in den ersten alkalischen Tropfen des Eluats nachweisbar, die aber nicht verworfen werden konnten, da in eben dieser Fraktion bereits ein grosser Anteil des T_3 bzw. T_4 eluiert wurde. Es kann sich hierbei um Spuren gelöster Austauscherbestandteile handeln, die sich nicht auszentrifugieren oder abfiltern liessen und linear proportional mit der Menge verwendeten Austauschers ansteigende Jodkonzentrationen bei der Mikrojodbestimmung vortäuschten. Auch durch mehrmaliges vorheriges Waschen und Umpuffern liess sich dieser "Blank" nicht beseitigen. Diese negative Eigenschaft, zu "bluten", haftete in unterschiedlichem Grade allen von uns getesteten Ionenaustauschern für den Konzentrierschritt an. Relativ am geringsten und gut standardisiert waren die Blindwerte bei Verwendung des Bio-Rex 70 (2.5.3.3.).

Zusätzliche "Blanks" von der vorgeschalteten Sephadex G-25-Trennsäule wurden nicht beobachtet, die "Blanks" von der Kationenaustauscher-Extraktionssäule wurden nicht in den T_3 - bzw. T_4 -Peak verschleppt.

Bei Chromatographie von T_3 - bzw. T_4 -Eichstandards über die ganze Prozedur führte der "Blank" von der Konzentrationsäule lediglich zu einer Parallelverschiebung gegenüber der KI^- -Standard-Eichkurve. Diese in der Serie konstanten Leerwerte wurden von Tag zu Tag mitbestimmt (2.5.3.3.), und mussten also lediglich von den jeweils gefundenen Messwerten von T_3 bzw. T_4 in der Mikrojodbestimmung subtrahiert werden (2.6.).

6. MATERIAL

6.1. JODAMINOSÄUREN

6.1.1. 127-Jodaminosäuren

Die folgenden stabilen Jodaminosäuren wurden von der Fa. Fluka AG Buchs, Schweiz, bezogen und nach Vorschrift bei ca. 4°C im Exsiccator aufbewahrt:

T₃ : 3,3',5-Trijod-L-thyronin puriss. MG 650,98

T₄ : L-Thyroxin-Natriumsalz purum MG 888,94

DIT: 3,5-Dijod-L-tyrosin purum MG 469,02

MIT: 3-Jod-L-tyrosin purum MG 307,09

Die Jodaminosäuren MIT, DIT, T₃ und T₄ sind in Aqua bidest. wenig, bei einem pH-Wert, bei dem die phenolische Hydroxylgruppe ionisiert ist, jedoch gut löslich. Aus diesem Grunde wurden die eingewogenen Substanzen in 0,1 N NaOH bei Zimmertemperatur eine Stunde mit dem Magnetkern gerührt. Durch Weiterverdünnen mit Aqua bidest. wurden die Standards für die Chromatographie hergestellt, sodass sie schliesslich in 10⁻³N NaOH vorlagen. Für Vorversuche wurden auch Weiterverdünnungen mit NaOH, NH₃ und Pufferlösungen (6.3.) angesetzt. Wegen der beschränkten Haltbarkeit ("Dejodierung", siehe 6.1.2.) wurden diese Lösungen jeweils frisch angesetzt.

Tetrajodthyroessigsäure (Tetrac) (Serva, Heidelberg) wurde wie die o.a. Standards für die Chromatographie gelöst.

6.1.2. 125-Jodaminosäuren

Die folgenden radioaktiv markierten Jodaminosäuren wurden von der Firma THE RADIOCHEMICAL CENTRE Amersham, England, bezogen. Je 0,2 mC wurden in ca. 1 ml 50 % wässriger Propylenglykollösung geliefert und mit sterilem 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 auf ein Gesamtvolumen von 200 ml gebracht. Diese radioaktiven Arbeitsstandards (2µC/ml) wurden in kleinen Portionen bis zum Gebrauch in bleiummantelten Gläsern im Kühlraum aufbewahrt:

T₃-¹²⁵I : Liothyronine-Il25

L-3,5,3'-Trijodthyronin in 3'-Position markiert
Spezifische Aktivität: 20-50 mC/mg Liothyronine

T₄-¹²⁵I : L-thyroxine-Il25

L-Thyroxin in 3'-(5'-)Position markiert
Spezifische Aktivität: 20-50 mC/mg Thyroxin

M¹²⁵IT : 3-Iodo-L-tyrosine-Il25

0,1-2 mC/mg Monojodtyrosin

D¹²⁵IT : 3,5-Dijodo-L-tyrosine-Il25

25-100 mC/mg Dijodtyrosin

Bei Aufbewahrung bei 4°C waren diese verdünnten Standardlösungen bis zu 2 Monate lang verwendbar, die Reinheit wurde laufend über unser chromatographisches System überprüft (vgl. 3.2.4.1., Rechromatographie). Ein Jodanteil (Damage) bis zu 8 % wurde toleriert.

Die Halbwertszeit von ¹²⁵I beträgt 60 Tage.

6.2. GELE UND AUSTAUSCHER FÜR DIE CHROMATOGRAPHIE

Dextrangele der Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden (in der BRD: Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt a.Main 1):

Sephadex G-10, G-15, G-25 fine und superfine, LH-20.
Quellen über Nacht in Aqua bidest.

Kationenaustauscher der Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif. (in der BRD: Bio-Rad Laboratories, Gräfelfing bei München):

AG 50W-X4, 50-100, 100-200 und minus 400 mesh (mesh = 16/Korngrösse in mm), Bio-Rex 70, 50-100 mesh.

Austauscher der Fa. Serva, Heidelberg (Originalware der Fa. Rohm & Haas Company, Philadelphia):

Kationenaustauscher: Amberlite JRC-50, JR-112.

Anionenaustauscher: IRA-93, IRA-401, Dowex 1x8, 2x8.

Kationenaustauscher wurden durch mehrfaches Vorwaschen mit 0,1 N HCl in die H^+ -Form gebracht, Anionenaustauscher mit 0,1 N NaOH in die OH^- -Form.

6.3. VERWENDETE PUFFER

0,05 N Kaliumphosphatpuffer pH 11,9:

Zu 2 Volumenteilen 0,025 M K_2HPO_4 wurde 1 Volumenteil 0,05 M KOH gegeben. Die Kontrolle mit dem pH-Meter (Digi 510, WTW, Weilheim) ergab jedesmal genau pH 11,9 (25°C).

0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 (steril):

0,05 M Na_2HPO_4 wurde mit 0,05 M NaH_2PO_4 auf pH 7,4 (25°C) eingestellt und sterilisiert.

6.4. REAGENTIEN FÜR DIE MIKROJODBESTIMMUNG

0,05 M Cer(IV)ammoniumsulfatlösung:

6,32 g $(\text{NH}_4)_4\text{-Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden in ca. 100 ml Aqua bidest. gelöst, vorsichtig 20 ml konz. H_2SO_4 zugegeben und mit Aqua bidest. ad 200 ml aufgefüllt (evtl. korrigieren, wenn abgekühlt!). Die tiefgelbe Lösung war, in braunen Flaschen bei Zimmertemperatur aufbewahrt, mindestens zwei Wochen haltbar.

Säuregemisch

20 ml 60 %ige HClO_4 werden 50 ml 65 %iger HNO_3 zugegeben und mit 0,1 N HCl ad 500 ml aufgefüllt. Die Lösung bleibt verschlossen eine Woche sicher stabil.

0,2 M Arsenige Säure

9,89 g As_2O_3 und 7,0 g NaOH-Plättchen werden mit 200 ml Aqua bidest. versetzt, kräftig geschüttelt und nach vollständiger Lösung mit ca. 500 ml weiterverdünnt. Nach Zugabe von 100 ml konz. H_2SO_4 und Abkühlung wird die Lösung ad 1000 ml aufgefüllt. Zur besseren Benetzung unseres Systems (siehe 2.5.2.2.) waren zuvor noch 1 ml Brij-Lösung (Fa. Technikon, Frankfurt) zupipettiert.

Spüllösung

1 N NaOH

KI-Eichstandards

Verdünnungsreihe von KI in 1 N NaOH:

0 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 8 - 10 ng I^-/ml

6.4.1. Reinheit der Reagentien für die Mikrojodbestimmung

Es wurden ausschliesslich Reagentien im Reinheitsgrad p.a. der Fa. Merck und Aqua bidest. verwendet. Wichtig ist die Beobachtung, dass u.a. alkalische Lösungen, in Gefässen aus PVC geliefert oder aufbewahrt (z.B. NH_3 , NaOH usw.), für unsere Bestimmung völlig unbrauchbar waren; sie verfälschten die Messwerte bei der chemischen Jodbestimmung (Blanks durch Freisetzung von Chlorid oder Weichmachern ? Vgl. 5.5.1.).

6.5. SERUM

6.5.1. Patientenserum

Die Gewinnung erfolgte in üblicher Weise wie zu anderen klinisch-chemischen Routineuntersuchungen. Wurde das Serum nicht sogleich weiterverarbeitet, bewahrten wir es in der Tiefkühltruhe bei -20°C auf.

6.5.2. Kontrollserum

Als Kontrollserum verwendeten wir einen bei -20°C in Portionen eingefrorenen Serumpool, der über länger als ein Jahr auch der Qualitätskontrolle für viele andere klinisch-chemische Bestimmungen diente.

6.5.3. Seruminkubation mit Jodaminosäuren

Wenn nicht anders beschrieben, wurde Serum mit den radioaktiven oder kalten Standardlösungen der Jodaminosäuren im Verhältnis 5 : 1 (V:V) gemischt und im Schüttelbad bei 37°C 15 min inkubiert. Nach früheren Erfahrungen (75, 25) gewährleistet dieses Verfahren Äquilibrierung zwischen endogenen und zugesetzten Schilddrüsenhormonen einerseits und den Serumproteinen andererseits.

7. DISKUSSION

7.1. METHODE

Die biologische Bedeutung des Trijodthyronins (T_3) wurde in den letzten Jahren immer klarer (vgl. 1, Einleitung), obwohl sein Gesamtgehalt im Serum, wie wir feststellen konnten, nur etwa ein Vierzigstel des Thyroxin-Gehaltes ausmacht (4.2.1.). In dieser vergleichsweise geringen Konzentration liegt auch die Hauptschwierigkeit bei der Bestimmung begründet.

Die früher publizierten Methoden, wie Dünnschicht- bzw. Papierchromatographie (19, 48, 68, 69, 76) und Gaschromatographie (30, 29) sind sehr aufwendig und nicht automatisierbar, vor allem aber hinsichtlich der Wiederfinderaten nur schwer standardisierbar. Das machte den Einsatz von "internal Standards" notwendig, die aber ihrerseits vor allem bei niedrigen Ausbeuten zu Falschkorrekturen führen können (19). Zudem wurde bei vielen Methoden die Bildung von Artefakten bei der Chromatographie beobachtet, die ebenso wie verschlepptes oder dejodiertes T_4 die gemessenen T_3 -Absolutspiegel verfälschten. In dieser Hinsicht wurden insbesondere die Verfahren mit Papierchromatographie in letzter Zeit stark kritisiert (4, 56, 19, 76).

Die vorliegende Methode hat dagegen folgende Vorteile:

a) Das Verfahren bedient sich ausschliesslich der Säulenchromatographie ohne jeglichen Zusatz von organischen Lösungsmitteln; vor der Abtrennung des T_3 vom T_4 wird keine Volumenreduktion durchgeführt. Dieses Vorgehen

vermindert erheblich die Gefahr der Entstehung von chromatographischen Artefakten, wie z.B. Esterbildung der Schilddrüsenhormone bei saurer alkoholischer Extraktion (4, 56, 76).

b) Der zeitgesteuerte Ablauf der Chromatographie (für simultan 25 Proben) über ein geschlossenes System von drei hintereinandergeschalteten Säulen und die Vollautomatisierung der Mikrojodbestimmung führten zu hohen und vor allem gut standardisierten Ausbeuten (durchschnittlich 87%). Auf die Zugabe eines internal Standards konnte damit verzichtet werden.

c) Die Abtrennung des T_3 vom T_4 erfolgt schonend mit einem alkalischen Puffer von geringer Ionenstärke auf der Basis der nichtionogenen Adsorption an Dextrangel. Dabei wird das T_3 deutlich vor dem T_4 von der Trennsäule eluiert; T_4 geht so mit einem Anteil von nur ca. 0,09 % in die T_3 -Bestimmung mit ein, wie wir durch Rechromatographieversuche nachweisen konnten (3.2.4.1.).

d) Die mikrochemische Jodbestimmung ist mit einer unteren Nachweisgrenze von 0,5 ng I^- /ml empfindlich genug, um auch sehr niedrige T_3 -Absolutspiegel im Serum von hypothyreoten Patienten hinreichend genau bestimmen zu können. Dabei werden maximal 2,5 ml Serum benötigt.

e) Die T_3 - und T_4 -Absolutspiegel werden nach der gleichen Bestimmungsmethode in einem Analysengang gemessen und lassen sich so gut vergleichen.

Die Qualität des erarbeiteten Verfahrens wurde eingehend überprüft.

Die Präzision von Tag zu Tag wurde mit einem Kontrollserum überwacht. Für die Bestimmung des absoluten T_3

lag der Variationskoeffizient unter 10%, für T_4 unter 7%, vergleichbar also mit enzymatischen klinischen Routinebestimmungen.

Die Wiederfinderaten von kaltem T_3 , die mit und ohne Zusatz von Serum bei 86% lagen, deckten sich genau mit der Recovery radioaktiv markierter Hormone. Nach der Korrektur, die wir bei allen Bestimmungen ausführten (2.6.), ergab sich damit eine Wiederfinderate von $99,3 \pm 5,6\%$ (3.2.3.2.). Hinsichtlich der Spezifität konnten wir eine Verfälschung der gewonnenen Messwerte durch MIT, DIT und endogenes Jodid ausschliessen. T_4 geht nur zu 0,09% in die T_3 -Bestimmung mit ein. Exogene "Verunreinigungen" des Serums durch verschiedene jodhaltige Kontrastmittel konnten allerdings nicht ausreichend abgetrennt werden; Tetrajodthyroessigsäure, eine Abbaustufe des Thyroxins, wurde zusammen mit diesem eluiert.

Sehr empfindlich ist der chemische Jodnachweis gegen Verunreinigungen z.B. der Reagenzien, die dahingehend aber laufend einfach überprüft werden konnten. Ein Blank über die ganze Bestimmungsprozedur von ca. 1 ng I⁻ pro ml Ansatz für die Mikrojodbestimmung konnte toleriert werden.

Trotz der Teilautomatisierung ist die vorliegende Methode allerdings für breit angelegte klinische Studien oder gar für den Routinebetrieb noch zu aufwendig und arbeitsintensiv.

In letzter Zeit wurden erste Ergebnisse zur radioimmunologischen T_3 -Bestimmung im unextrahierten Serum publiziert (8, 22,43). Die Richtigkeit dieser Methoden

ist jedoch umstritten, die Störquellen liegen vorwiegend in der Kreuzreaktivität des T_3 -Antikörpers mit T_4 und der Konkurrenz der bindenden Serumproteine. Diese Störfaktoren könnten durch eine Verbindung unserer Methode der Serumextraktion und Abtrennung des T_3 vom T_4 mit dem spezifischen und hochempfindlichen radioimmunologischen T_3 -Nachweis ausgeschaltet werden.

7.2. KLINIK

Der mit der vorliegenden Methode bestimmte Normalwert des Gesamt- T_3 im Serum beträgt 146 ± 20 ng/100 ml ($\bar{x} \pm s$), früher angegebenen Normalbereichen gegenüber liegt er damit sehr viel tiefer (19, 48, 68, 69, 76, 52, 29, 30). Einige radioimmunologisch bestimmte (43) und die Ergebnisse einer korrigierten Methode nach STERLING (19) scheinen jedoch unsere Angaben zu bestätigen. Das Gesamt- T_4 betrug im Normalkollektiv $7,65 \pm 1,07$ $\mu\text{g}/100$ ml und deckte sich damit mit dem PB^{127}I -Normalbereich. Das aus den Einzelwerten gemittelte Verhältnis T_3 zu T_4 betrug $(19,6 \pm 4,1) \cdot 10^{-3}$ oder 1:51 auf Gewichtsbasis, beziehungsweise 1:44 auf molarer Basis. Abgesehen von den angeschnittenen Fehlerquellen (vgl. 7.1.) können die differenten Normalbereiche für T_3 nicht nur im unterschiedlichen methodischen Vorgehen begründet sein, sondern sie sind auch offensichtlich abhängig von der Jodaufnahme der untersuchten Personen. Als Parameter dafür kann die tägliche Urin-Jodausscheidung herangezogen werden, sie liegt im Jodmangelgebiet München nur bei etwa 40 $\mu\text{g}/\text{d}$, während sie in Nicht-Kropfendemiegebieten 100 $\mu\text{g}/\text{d}$ deutlich übersteigt (57, 66). Wir fanden nämlich bei den von uns untersuchten Patienten mit blander Struma eine signifikante Erhöhung der absoluten T_3 -Spiegel bei erniedrigten absoluten T_4 -Spiegeln und vor allem eine signifikante Erhöhung des Quotienten $T_3:T_4$ auf ca. 1:35 gegenüber 1:51 bei schilddrüsengesunden Personen (4.2.2.).

Diese disproportioniert erhöhten Serum- T_3 -Spiegel können als ein Versuch der Schilddrüse gedeutet werden, die Euthyreose bei endemischer Struma zu erhalten. Es erscheint

naheliegender, dass bei Substratmangel (Jod) im Körper vermehrt das biologisch wirksamere Hormon T_3 gebildet wird, das ein Jodatomen weniger besitzt als das T_4 (74). Dieses Phänomen der "kompensatorischen T_3 -Mehrsekretion bei Jodmangel" hat möglicherweise einen kausalen Bezug zu den unter Jodmangel beobachteten erhöhten TSH-Umsätzen bzw. -Antworten auf TRF-Stimulation (2,3,12, 14,65,48); von manchen Autoren wird das jedoch bestritten (77, 24).

In diesem Sinne könnte auch die beobachtete relative T_3 -Mehrsekretion bei Hypothyreose gedeutet werden. Bei zwei Patienten mit klinisch eindeutiger Symptomatik einer Schilddrüsenunterfunktion und praktisch fehlendem T_4 fanden sich sogar noch normale T_3 -Spiegel (69, 68). Wie gross die Zunahme des gesamten, d.h. des freien und proteingebundenen T_3 im Serum sein muss, um eine gegebene Abnahme des totalen, d.h. ebenfalls des freien und protein- gebundenen T_4 -Gehaltes zu kompensieren, muss noch offen bleiben.

Bei unseren Patienten mit Hyperthyreose fand sich in Übereinstimmung mit der Literatur in der Mehrzahl sowohl ein erhöhtes absolutes T_3 als auch T_4 . Einen parallelen Abfall der Serum T_3 - und T_4 -Spiegel konnten wir bei einer Patientin unter thyreostatischer Therapie verfolgen.

Nun sind in der letzten Zeit von verschiedenen Autoren Fälle von T_3 -Thyreotoxikose beschrieben bzw. postuliert worden (43, 48, 68, 69, 70, 76), sie scheinen keineswegs so selten zu sein, wie bisher angenommen. Auch wir konnten bei drei Patienten die klinisch eindeutige Symptomatik einer Hyperthyreose durch den Nachweis isoliert erhöhter

T_3 -Spiegel erklären. Dabei ergaben die Bestimmungen des absoluten T_4 , des $PB^{127}I$ und der T_3 -in vitro-Test im Sinne der Definition Normalwerte, hätten also die Diagnose Hyperthyreose nicht bestätigen können. Bei einem dieser Patienten lag der radiodiagnostische Befund eines autonomen Adenoms der Schilddrüse vor. Ob eine Hyperthyreose gehäuft als T_3 -Thyreotoxikose bei solchen autonomen Adenomen oder Jodmangel auftritt, wird diskutiert (69, 54, 43).

8. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Methode für die simultane Analyse von 25 Proben erarbeitet und beschrieben, welche die getrennte Bestimmung des Gesamt-Trijodthyronin und -Thyroxin im Serum innerhalb von etwa 9 Stunden erlaubt. Die Extraktion der Schilddrüsenhormone aus dem Serum, die Abtrennung des T_3 vom T_4 und die Konzentrierung der jeweiligen Eluate erfolgte halbautomatisch und zeitgesteuert in einem geschlossenen chromatographischen System, bestehend aus drei aufeinanderfolgenden Säulen:

Der Extraktionssäule mit einem stark sauren Kationenaustauscher,
der Trennsäule mit dem Dextrangel Sephadex G-25 superfine und
der Konzentriersäule mit einem schwach sauren Kationenaustauscher.

Nach Volumeneinengung unter rezirkulierendem Stickstoff und gleichzeitiger reduktiver Dejodierung mit kupferaktiviertem Zink konnte der Jodgehalt der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 an einer Jodideichkurve mit einer automatischen Mikrojodbestimmung nach der $Ce(IV)/as(III)$ -Reaktion gemessen werden.

Die Wiederfinderaten für T_3 und T_4 über das gesamte Verfahren lagen bei $86,7 \pm 4,9$ bzw. $88,4 \pm 4,1$ %, der Einsatz eines "internal standard" war somit nicht erforderlich. Mit Variationskoeffizienten unter 10% für T_3 und unter 7% für T_4 war die Präzision der Bestimmung von Tag zu Tag zufriedenstellend.

Als Normalbereich für das absolute T_3 im Serum fanden wir 146 ± 20 ng/100 ml, für T_4 $7,65 \pm 1,07$ μ g/100 ml ($\bar{x} \pm s$).

Bei Patienten mit blander Struma waren die absoluten T_4 -Spiegel im Vergleich zu Schilddrüsengesunden signifikant erniedrigt, während die T_3 -Spiegel und damit der Quotient $T_3:T_4$ signifikant erhöht lagen. Es wurde diskutiert, dass diese disproportionierte T_3 -Mehrsekretion bei endemischer Struma als Kompensationsmechanismus zur Erhaltung einer Euthyreose bei Jodmangel gedeutet werden kann. Bei Hypothyreosen fanden wir selbst bei nicht mehr nachweisbarem T_4 noch eine T_3 -Restsekretion. Schliesslich konnten wir bei der Untersuchung von Patienten mit Hyperthyreose und autonomen Adenomen der Schilddrüse in drei Fällen eine sogenannte T_3 -Thyreotoxikose diagnostizieren.

LITERATUR

1. BARKER, S.B.: Further studies on the ceric sulphate-arsenious acid reaction for the detection of various analogues of thyroxine. *Biochem. J.* 90, 214 (1964).
2. BECKERS, C. and C. CORNETTE: TSH production rate in nontoxic goiter. *J. clin. Endocr.* 32, 852 (1971).
3. BECKERS, C., C. CORNETTE and A. MASKENS: Abstract, 53. Meet. Endocr. Soc., San Francisco (1971).
4. BELLABARBA, D.: Formation of esters of thyroxine and triiodothyronine during alcoholic extraction. *J. clin. Endocr.* 29, 1510 (1969).
5. BERLINER, E.: The current date of positive halogenating agents. *J. chem. Educ.* 43, 124 (1966).
6. BILLEWICZ, W.Z., R.S. CHAPMAN, J. CROOKS, K.E. DAY, J. GOSSAGE, E. WAYNE and J.A. YOUNG: Statistical method applied to the diagnosis of hypothyroidism. *Quart. J. Med.* 38, 255 (1969).
7. BLOCK, R.J. and R.H. MANDEL: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 102, 87 (1964).
8. BROWN, B.L., R.A. SHING, J.H. ELLIS and W.S. REETH: Specific antibodies to triiodothyronine hormone. *Nature (Lond.)* 226, 359 (1970).
9. BÜTNER, H., E. HANSERT und D. STAMM in H.U. BERGMAYER: *Methoden der enzymatischen Analyse.* Verl. Chemie, Weinheim, Bd. I (1970).
10. BOWDEN, C.H., N.F. MACLAGAN and J.H. WILKINSON: The application of the ceric sulphate-arsenious reaction to the detection of thyroxine and related substances. *Biochem. J.* 59, 93 (1955).
11. BOWDEN, C.H., N.F. MACLAGAN and J.H. WILKINSON: The metabolism of thyroid hormones: 2. Detection of thyroxine and triiodothyronine in human plasma. *Biochem. J.* 67, 5 (1957).
12. COBLE, Y.D. and P.O. KOHLER: Plasma TSH levels in endemic goiter subjects. *J. clin. Endocr.* 31, 220 (1970).
13. CROOKS, J., I.P.C. MURRAY and E.J. WAYNE: Statistical methods applied to the clinical diagnosis of thyrotoxicosis. *Quart. J. Med.* 28, 211 (1959).

14. DELANGE, F., J.R. HERSEMAN and A.M. ERMANS: Relationship between the serum thyrotropin level, the prevalence of goiter and the pattern of iodine metabolism in Laysan Island.
J. clin. Endocr. 33, 261 (1971).
15. DEMAN, J.: Iodine catalysis in the ceric-arsenite reaction. Role played by the chloride ion.
Mikrochim. Acta 67 (1964).
16. DETERMANN, H.: Gelchromatographie. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1967).
17. JUBRAVICIC, M.: Determination of iodine in natural waters (sodium chloride as a reagent in the catalytic reduction of ceric ions).
Analyst 80, 295 (1955).
18. EDELHÖCH, H.: The properties of thyroglobulin. VIII. The iodination of thyroglobulin.
J. biol. Chem. 237, 2778 (1962).
19. FISHER, D.A. and J.H. DUSSAULT: Contribution of methodological artifacts to the measurement of T_3 concentration in serum.
J. clin. Endocr. 32, 675 (1971).
20. FLODIN, P.: Dextran gels and their applications in gel filtration.
Dissertation, Uppsala (1962).
21. GALTON, V.A. and R. PITT-RIVERS: A quantitative method for the separation of thyroid hormones and related compounds from serum and tissues with an anion-exchange resin.
Biochem. J. 72, 340 (1959).
22. GHARIB, H., E.B. MAYBERRY and R.J. RYAN: Radioimmunoassay for triiodothyronine: A preliminary report. J. clin. Endocr. 31, 709 (1971).
23. GRUBBS, J. and R. PITT-RIVERS: The identification of 3,5,3'- T -triiodothyronine in human plasma.
Lancet 1, 429 (1952).
24. HALL, R., J. MARRAS and D.J. GRANTON: Radioimmunoassay of human serum thyrotropin.
Brit. med. J. 1, 582 (1971).
25. HALLHUBER, G.: Ein säulenchromatographisches Verfahren zur Auftrennung der Jodaminosäuren im Serum unter besonderer Berücksichtigung der Trennung von Trijodthyronin und Thyroxin.
Dissertation, Universität München (1966).

26. HARRINGTON, C.R.: Chemistry of thyroxine. I. Isolation of thyroxine from the thyroid gland. *Biochem. J.* 20, 293 (1926).
27. HARRINGTON, C.R. and G.BARGER: Chemistry of thyroxine. III. Constitution and synthesis of thyroxine. *Biochem. J.* 21, 169 (1927).
28. HOCH, H., S.L.SINNETT and T.H.McGAVACK: The determination of iodine in biologic material. *Clin. Chem.* 10, 799 (1964).
29. HOLLANDER, C.S.: On the nature of the circulating thyroid hormone: Clinical studies of triiodothyronine and thyroxine in serum using gas chromatographic methods. *Trans. Ass. Amer. Physicians* 81, 76 (1968).
30. HOLLANDER, C.S., T.MITSUMA, L.SHENKMAN, P.WOLFE and M.C.GERSHENGORN: Thyrotropin releasing hormone: Evidence for thyroid response to intravenous injection in man. *Science* 175, 209 (1972).
31. HORN, K., R.LANDGRAF, T.RUHL and P.C.SCRIBA: Verbesserte mikrochemische Jodbestimmung von Schilddrüsenhormonen. *Z. Anal. Chem.* 252, 267 (1969).
32. HORN, K. und P.C.SCRIBA: Zur $PB^{127}I$ - Bestimmung. *Technicon Symposium* 70, Sonderdr. R863 (1970).
33. HORN, K. und P.C.SCRIBA: Klinisch-chemische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik. I. Bestimmung des proteingebundenen Jods im Serum ($PB^{127}I$). *Dtsch. Ges. Klin. Chem. Mittlg.* 2, 3 (1970).
34. HORN, K., G.HALLHUBER, T.RUHL and P.C.SCRIBA: Separation and microchemical determination of serum triiodothyronine and thyroxine. *Acta endocr. (Kbh.) Suppl.* 152, 85 (1971).
35. HORN, K., J.HENNER und P.C.SCRIBA: Klinisch-chemische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik. II. Automatisierter T_3 - in vitro - Test. *Dtsch. Ges. Klin. Chem. Mittlg.* 2, 29 (1971).
36. HORN, K., H.BORCHWAK, J.HABERMANN, M.RETCIG, A.NEUBAUER and P.C.SCRIBA: Total serum T_3 and T_4 in nontoxic goiter and autonomous adenoma. *Acta. endocr. (Kbh.) Suppl.* 159, 8 (1972).
37. HORN, K., T.RUHL and P.C.SCRIBA: Semiautomatic method for the separation and determination of total triiodothyronine and thyroxine in serum. *Z. Klin. Chem.* 10, 99 (1972).

38. KENDALL, E.C.: The isolation in crystalline form of the compound containing iodine which occurs in the thyroid.
J. Amer. Med. Ass. 64, 2042 (1915).
39. KLEIN, E., H.-L. KRÜSKEMPER, D. REINWEIN, K. SCHWANZ und P.C. SCRIBA: Klassifikation der Schilddrüsenerkrankheiten.
Dtsch. med. Wschr. 96, 752 (1971).
40. LEE, N.D., R.J. HENRY and J.O. GOLUB: Determination of the free thyroxine content of serum.
J. clin. Endocr. Metab. 24, 486 (1964).
41. LISSITZKY, S., J. BISMUTH and M. ROLLAND: Séparation des composés iodés du sérum et de la thyroïde par filtration sur gel de dextrane (Sephadex).
Clin. Chim. Acta. 7, 183 (1962).
42. MALKIN, M.H.: An ultramicro protein bound iodine method on capillary blood.
J. Clin. Endocr. 25, 28 (1965).
43. NITSUMA, T., M.C. GERSHENGORN, J. COLUCCI and C.S. HOLLANDER: Radioimmunoassay of triiodothyronine in unextracted human serum.
J. Clin. Endocr. 33, 364 (1971).
44. MURPHY, B.P.: The determination of thyroxine by competitive protein-binding analysis employing an anionexchange resin and radiothyroxine.
J. Lab. clin. Med. 66, 161 (1965).
45. MOUGEY, E.H. and J.W. MASON: Separation of some iodoamino acids and iodide by gel filtration.
Analyt. Biochem. 6, 223 (1963).
46. MÜHLEN, A. von zur, R.D. HESCH and J. KÖBBERLING: Thyrotrophin releasing factor (TRF) in the diagnosis of thyroid disorders: its application in different states of Graves' disease.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 155, 6 (1971).
47. MÜLLER, K., H. SKRUBE und H. SPITZY: Über den katalytischen Einfluß der Schilddrüsenhormone und verwandter Substanzen auf die Reduktion von Cer(IV)-Sulfat durch Arsenige Säure.
Microchim. Acta 6, 1081 (1962).
48. NAUMANN, J.A., A. NAUMANN and S.C. WERNER: Total and free triiodothyronine in human serum.
J. clin. Invest. 46, 1346 (1967).
49. OBERDISSE, K. und E. KLEIN: Die Krankheiten der Schilddrüse. Stuttgart, Thieme (1967).

50. ODDIE, T.H., D.A. FISHER, J.H. DUSSAULT and C.S. THOMPSON: Triiodothyronine turnover in euthyroid subjects.
J. clin. Endocr. 33, 653 (1971).
51. ORMSTON, B.J., R. GARRY, R.J. CRYER, G.M. EMMETT and R. HALL: Thyrotropin-releasing hormone as a thyroid-function test.
Lancet 1971 II, 10.
52. ORTNER, H.M., B.E. SCHREIBER und H. SPITZY: Ein neues Isolierverfahren für die Schilddrüsenhormone und ihre Vorstufen aus dem Blutserum.
Clin. Chim. Acta 30, 129 (1970).
53. PICKARDT, C.R., K. HORN und P.C. SCRIBA: Moderne Aspekte der Schilddrüsenfunktionsdiagnostik.
Internist 13, 133 (1972).
54. PINEDA, G., E. SILVA, A. GIANETTI, C. STEVENSON and J. BARZELATTO: Influence of iodine deficiency upon PBI in hyperthyroidism.
J. clin. Endocr. 30, 120 (1970).
55. RADICHEVICH, I. and E. VOLPERT: Estimation of iodo-compounds in biological material. In: V. STOLIC: Endocrinologia experimentalis, 105.
Slovak Academy of Science, Bratislava (1966).
56. RADICHEVICH, I. and S.C. WERNER: No interference from thyroxine methyl ester with T₃ determination by Naumann, Naumann and Werner method.
J. clin. Endocr. 32, 350 (1971).
57. ROBBINS, J. and J.E. RALL: The iodine-containing hormones. In: C.H. GRAY and A.L. BACHARACH: Hormones in blood. 2. Ed. London - New York: Academic Press (1957).
58. ROCHE, J., S. LISSITZKY and R. MICHEL: zit. n. 57.
C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris 234, 997, 1278 (1952).
59. RUHL, T., J. HABERMANN, K. HORN and P.C. SCRIBA: Separate determination of total T₃ and T₄ in serum by a semiautomatic method.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 155, 8 (1971).
60. SANDELL, E.B. and J.M. KOLTHOFF: Microdetermination of iodine by a catalytic method.
Mikrochim. Acta 1, 9 (1957).
61. SANZ, M.C., T. HACHIMURA and I.J. GREEN: Clin. Chim. Acta 1, 570 (1956).

62. SCRIBA, P.C., R.LANDGRAF, H.G.HEINZE und L.SCHWARZ: Bestimmung der Bindung von Trijodthyronin an Serumproteine mittels Dextrangelfiltration. Klin. Wschr. 44, 69 (1966).
63. SCRIBA, P.C., H.G.HEINZE, R.LANDGRAF, K.W.FREY und K.SCHWARZ: klinische Bedeutung der Bestimmung der Bindung von Trijodthyronin an Serumproteine mittels Dextrangelfiltration. Klin. Wschr. 44, 131 (1966).
64. SCRIBA, P.C.: Die diagnostische Wertigkeit des Trijodthyronintestes. Dtsch. med. Wschr. 94, 1455 (1969).
65. SCRIBA, P.C. und K.HORN: Pathogenese und internistische Therapie der sogenannten euthyreoten Struma. (Übersicht). Med. Klin. 64, 1737 (1969).
66. SCRIBA, P.C.: Schilddrüsenerkrankheiten. In: K.SCHWARZ und P.C.SCRIBA: Endokrinologie für die Praxis. Lehmann, München (1970).
67. SCRIBA, P.C., H.BOROWZAN, F.ERHARDT, J.GRÜNER, J.INSERMAN, H.G.HEINZE, R.HORN, C.W.FICKERT, M.RETTIG and T.RUHL: Total serum T_3 and TSH response to TRH stimulation in patients with endemic goiter. Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 179, 55 (1975).
68. STERLING, K., D.BELLABARBA, E.S.NEWMAN and M.A.BRENNER: Determination of triiodothyronine concentration in human serum. J. clin. Invest. 48, 1150 (1969).
69. STERLING, K.: The significance of circulating triiodothyronine. Recent. Progr. Horm. Res. 26, 249 (1970).
70. STERLING, K., S.REFETOFF and H.A.SHELENKOW: T_3 - thyrotoxicosis. Thyrotoxicosis due to elevated serum triiodothyronine levels. J. Amer. med. Ass. 213, 571 (1970).
71. SMITH, G.F.: Cerate Oxidimetry. 2. Ed. G.F.Smith Chemical Co., Columbus, Ohio (1964).
72. STOLC, V.: Optimal conditions for the catalytic action of iodine in the Sandell - Kolthoff reaction. Mikrochim. Acta 710, (1961).
73. STRICKLAND, R.D. and G.M.FALCNEY: Determining serum protein-bound iodine. Analyt. Chem. 29, 1870 (1957).

74. STUDER, H. und R.A.GREER: Die Regulation der Schilddrüse bei Jodmangel. Huber, Bern und Stuttgart. (1966).
75. STUMPF, W. und E.H.GRAUL: In-vitro - Bestimmung der Schilddrüsenfunktion mit dem Serum- T₃ - Test. Med. Klin. 58, 192 (1963).
76. WAHNER, H.W. and C.A.GORMAN: Interpretation of serum triiodothyronine levels measured by the Sterling technic. New Engl. J. Med. 284, 225 (1971).
77. WAHNER, H.W., W.E.MAYBERRY, E.GAITAN and E.J.GAITAN: Endemic goiter in the Canca Valley. III. Role of serum TSH in goitrogenesis. J. clin. Endocr. 32, 491 (1971).
78. WEYGAND, C.: Organisch-chemische Experimentierkunst. Joh. Ambr. Barth. Leipzig (1938).
79. ZACH, O.: Zur Dextrangelchromatographie von Schilddrüsenhormonen. Inaugural - Dissertation, München (1971).

LEBENS LAUF

Am 27. Mai 1947 bin ich in Ansbach/Mfr. geboren und mit zwei Schwestern und einem Bruder im Hause unserer Eltern, dem Arzt für Allgemeinmedizin Dr. med. Johann Georg Ruhl und seiner Frau Wilma Helene geborene Hofer aufgewachsen.

Nach vier Jahren Volksschule besuchte ich das humanistische Gymnasium Carolinum Ansbach und absolvierte dort im Juli 1966.

Das Medizinstudium begann ich im gleichen Jahr an der Ludwig - Maximilians - Universität München, wo ich dann auch die Naturwissenschaftliche Vorprüfung nach dem Sommersemester 1967 und die Ärztliche Vorprüfung im Frühjahr 1969 ablegte.

Von Ende 1969 an arbeitete ich bei Prof. Dr. med. P.C. Scriba in der II. Medizinischen Klinik der Universität an meiner Dissertation.

Das Staatsexamen in Humanmedizin legte ich ebenfalls in München im Dezember 1972 ab.

Seit Juni 1973 bin ich verheiratet und wohne mit meiner Frau Christa Brigitte geborener Hartmann in Bergen bei Neuburg/Do., ihrem Dienstort als Volksschullehrerin.

Zur Zeit bin ich als Medizinalassistent im Städtischen Krankenhaus Ingolstadt tätig.

